

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013832205

WPI Acc No: 2001-316417/200133

DNA encoding MTR1 protein, useful e.g. for treating Beckwith-Wiedemann syndrome and tumors, also related proteins and antibodies

Patent Assignee: UNIV GUTENBERG JOHANNES (UYGU-N); UNIV MAINZ GUTENBERG JOHANNES (UYMA-N)

Inventor: PELLETIER J; PRAWITT D; ZABEL B

Number of Countries: 095 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200132693	A2	20010510	WO 2000DE3876	A	20001106	200133 B
DE 19953167	A1	20010726	DE 1053167	A	19991104	200143
AU 200123475	A	20010514	AU 200123475	A	20001106	200149
EP 1237910	A2	20020911	EP 2000987076	A	20001106	200267
			WO 2000DE3876	A	20001106	

Priority Applications (No Type Date): DE 1053167 A 19991104

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 200132693 A2 G 46 C07K-014/00

Designated States (National): AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

Designated States (Regional): AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZW

DE 19953167 A1 C07K-014/705

AU 200123475 A C07K-014/00 Based on patent WO 200132693

EP 1237910 A2 G C07K-014/00 Based on patent WO 200132693

Designated States (Regional): AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI TR

Abstract (Basic): WO 200132693 A2

NOVELTY - DNA sequence (I) encoding the MTR1 protein (sequence reproduced in specification) that:

(i) has at least one biological activity of a TRP (transient receptor potential) family protein;

(ii) is connected with etiology of BWS (Beckwith-Wiedemann syndrome) and/or

(iii) is connected with tumors involving 11p15.5 abnormalities.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(a) a DNA sequence (Ia) encoding a protein with the same biological activity as MTR1;

(b) a ribozyme complementary to (I) and able to bind to and cleave RNA transcribed from it;

(c) an antisense RNA complementary to (I) and able to bind to RNA transcribed from it;

(d) expression vector (EV) containing (I), the specified ribozyme or DNA encoding the specified antisense RNA;

(e) host cells containing EV;

(f) MTR1 protein (II), its fragments or proteins with equivalent biological activity encoded by (Ia);

(g) production of (II) or its equivalents by culturing cells of (e);

(h) antibodies (Ab), or their fragments, that bind specifically to (II) or its equivalents;

(i) pharmaceutical composition containing (I), the specified ribozymes or antisense sequences, EV, (II) or its equivalents, or Ab and its fragments;
(j) diagnostic method for determining abnormal MRT1 expression; and
(k) kit for method (k) containing (I) or Ab (or their fragments).
ACTIVITY - Anticancer; developmental.

No biological data given.

MECHANISM OF ACTION - MRT1 is involved in regulation of intracellular calcium ion levels, which are essential for cellular responses to hormones and/or growth factors; also in apoptosis and cell growth, death and differentiation, and in urogenital diseases, including polycystic kidney disease.

USE - (I) Also related ribozymes, antisense RNA, proteins and antibodies (Ab)) are used to treat or prevent diseases associated with altered expression of the MRT1 gene or activity of its protein, or with calcium influx into cells, e.g. BWS, Wilms tumor, rhabdoid tumors and rhabdomyosarcoma. Probes from (I), or Ab, are also used for diagnosis of such diseases. (I) can also be used for recombinant production of MRT1 proteins (II) (used for analysis, characterization and therapy), as tissue or chromosomal markers, for identifying genetic diseases and related sequences, as primers for genetic fingerprinting, as source of oligonucleotides for biochips, and to raise anti-protein or anti-DNA antibodies. (II) are used to raise Ab, as reagents in competitive assays for (II), as tissue markers; for identifying interacting proteins and in screening for (ant)agonists.

pp; 46 DwgNo 0/12

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-014/00; C07K-014/705

International Patent Class (Additional): A61K-038/17; A61K-039/395;

A61K-048/00; A61P-035/00; A61P-043/00; C12N-015/12

?



⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 53 167 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 199 53 167.6
⑳ Anmeldetag: 4. 11. 1999
㉑ Offenlegungstag: 26. 7. 2001

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/705
C 12 N 15/12
A 61 K 38/17
A 61 K 39/395
A 61 K 48/00
A 61 P 35/00
A 61 P 43/00

DE 199 53 167 A 1

⑦① Anmelder:
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, 55122
Mainz, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦② Erfinder:
Prawitt, Dirk, 55131 Mainz, DE; Pelletier, Jerry,
Montreal, CA; Zabel, Bernhard, 55131 Mainz, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Mit TRP-Proteinen verwandtes Protein MTR1 und dieses codierende DNA-Sequenz

⑤⑦ Beschrieben werden das Protein MTR1, das mindestens eine biologische Aktivität eines TRP-Proteins aufweist und/oder mit der Ätiologie von BWS und/oder mit 11p15.5-Veränderungen assoziierten Tumoren in Zusammenhang steht, sowie mit MTR1 verwandte Proteine und diese Proteine codierende DNA-Sequenzen. Ferner werden an MTR1 bzw. dazu verwandte Proteine bindende Antikörper sowie gegen die Expression von MTR1 gerichtete Antisense-RNAs bzw. Ribozyme beschrieben und Arzneimittel und Diagnoseverfahren, bei denen die vorstehenden Verbindungen zur Anwendung kommen.

DE 199 53 167 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft das Protein MTR1, das mindestens eine biologische Aktivität eines Proteins der TRP-Familie aufweist, beispielsweise an der Ca^{2+} -Regulation innerhalb der Zelle beteiligt ist, und/oder mit der Ätiologie von BWS und/oder mit 11p15.5-Veränderungen assoziierten Tumoren in Zusammenhang steht. Weiter betrifft die Erfindung mit MTR1 verwandte Proteine und diese Proteine codierende DNA-Sequenzen.

Anhand der Ergebnisse von zytogenetischen und molekularen Studien wurden verschiedene Erkrankungen mit dem humanen chromosomalen Bereich 11p15.5 in Verbindung gebracht. Die vorherrschende und die höchste Komplexität aufweisende Erkrankung ist dabei das Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), das in einer Häufigkeit bei ca. einer von 13700 Geburten auftritt. Die Hauptmerkmale dieser erbten Erkrankung sind Nabelbruch, Makroglossie und Riesenwuchs kombiniert mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Tumoren, z. B. Wilms Tumor (WT), Rhabdoid-Tumore und Rhabdomyosarcoma. Obwohl die Mehrzahl der BWS-Fälle nicht familiär gehäuft (= "sporadisch") auftritt, segregieren einige wenige Fälle autosomal dominant mit einem praktisch ausschließlich mütterlichen Vererbungsgang. In mit BWS in Zusammenhang stehenden Tumoren wird häufig der Verlust der Heterozygotität (LOH) für 11p15.5 unter Beteiligung des mütterlichen Allels beobachtet. Die beobachtete funktionelle Ungleichheit der väterlichen und mütterlichen Allele in somatischen Zellen beruht auf einer epigenetischen Modifikation, die "genomic imprinting" genannt wird. Es konnte gezeigt werden, daß die Störung dieses "imprinting" zu einer Entwicklungs-Fehlregulation führt, die wiederum in Fehlbildungen und bösartigen Tumoren resultiert. Der Verlust des "imprinting" (LOI) von 11p15.5-Genen findet sich häufig in mit BWS in Zusammenhang stehenden Tumoren. Inzwischen wurde ein Bereich zwischen den chromosomalen Markern D11S648 und D11S1318 des Chromosoms 11 kartiert. Dieser umfaßt die "BWS critical region 1" (BWSCR1: D11S679-D11S551), welche einen Bereich darstellt, der durch die Bruchstellen chromosomaler Rearrangements in BWS-Patienten definiert wurde.

Verschiedene 11p15-Gene mit Funktionen, die mit dem Wachstum in Zusammenhang stehen, wurden bereits charakterisiert. Dazu gehört beispielsweise IGF2. IGF2 ist ein väterlich transkribierter mit Insulin verwandter Faktor für die Wachstumsregulation mit einer Schlüsselrolle bei der Hormon-gesteuerten Zellproliferation. Eine signifikante Anzahl von BWS-Patienten bzw. Patienten mit Wilms Tumor zeigen hinsichtlich IGF2 eine einen Elternteil betreffende Disomie (patUPD; patUPD = paternale uniparentale Disomie, d. h. das väterliche Allel [hier: von IGF2] liegt doppelt vor, das mütterliche fehlt) oder einen Verlust der Heterozygotität (LOH).

Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Gene bzw. deren Produkte zu identifizieren und bereitzustellen, die mit BWS und/oder mit BWS assoziierten Tumoren in Zusammenhang stehen und gegebenenfalls von diagnostischem und/oder therapeutischem Nutzen sind.

Die Lösung dieses technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt.

Es wurde überraschenderweise ein Gen (MTR1) innerhalb von Chromosom 11 (11p15.5) gefunden, das über die vorstehenden Eigenschaften verfügt.

MTR1 ist in 11p15.5 zwischen TSSC4 (= Gen Nr. 4 aus einem 2,5 Mb "tumor-suppressing subohrosomal transferable fragment" der humanen Chromosomenregion 11p15) und KvLQT1 (auf Chromosom 11 lokalisiertes LQT1-Gen) lokalisiert und wird als 4,5 kb Transkript in verschiedenen fötalen Geweben und Geweben von Erwachsenen transkribiert. TSSC4 und KvLQT1 sind bekannte Gene, die in 11p15.5 lokalisiert sind und hier als chromosomale Marker dienen. Der offene Leserahmen von MTR1 teilt sich in 24 Exons auf, von denen Exon 18 alternativ gespleißt wird, was zu zwei Proteinen mit 872 bzw. 1165 Aminosäuren führt. Die Menge der MTR1-Transkripte ist in Wilms Tumoren und Rhabdomyosarcomen erhöht. MTR1 kartiert in der Nähe einer Translokations bruchstelle in der rhabdoiden Tumorzelllinie TM87-16. Darüber hinaus wird im GM-Hybridzellsystem MTR1 nur vom väterlichen Chromosom 11 transkribiert, was auf eine allelspezifische Inaktivierung der mütterlichen Kopie durch "genetic imprinting" hinweist.

Das von MTR1 codierte Protein gehört zur Trp (transient receptor potential)-Proteinfamilie. Diese Zugehörigkeit ergibt sich nicht allein aus Sequenzhomologien, sondern auch die Transmembran-Domänen in MTR1 sind in einer Anzahl geclustert und weisen Zwischenräume auf, die denen der Transmembran-Domänen der TRP-Genfamilie entsprechen. Ein hochkonserviertes Motiv (EWKFAR) kurz nach der letzten Transmembran-Domäne ist in den Proteinen vorhanden, die von mehr als 90% aller TRP-Gene codiert werden. Die TRP-Genfamilie ist für den Agonisten-aktivierten Ca^{2+} -Einstrom in Zellen ausschlaggebend. Durch den Einstrom der Ionen wird der Ca^{2+} -Vorrat, der durch eine Reihe von Stimuli aufgebraucht wird, aufgefrischt und dieser ist auch essentiell für angemessene zelluläre Antworten gegenüber Hormonen und/oder Wachstumsfaktoren. Für IGF-1, das wie IGF-2 ein Wachstumsfaktor ist, konnte gezeigt werden, daß dieses das Fortschreiten des Zellzyklus in verschiedenen Zelltypen fördert und auch bei der Tumorbildung eine wichtige Rolle spielt. Da die Hemmung des Calciums-Eintritts die Wachstum-fördernden Wirkungen von IGF-1 hemmt, ist die Stimulation des Calcium-Eintritts für die Wachstumsinduktion essentiell. Der Bereich der höchsten Homologie zwischen MTR1 und den Trp-Genen ist um den Porenbereich und der letzten Transmembran-Domäne zu finden, was die Funktion von MTR1 bei der Ca^{2+} -Regulation in Zellen nahelegt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz, die ein Protein (MTR1) mit einer der in Fig. 4 gezeigten Aminosäuresequenzen codiert, wobei das Protein (MTR1) zumindest eine biologische Aktivität eines Proteins der TRP-Familie aufweist/oder und an der Ätiologie von BWS und/oder von mit 11p15.5-Veränderungen assoziierten Tumoren in Zusammenhang steht. Vorzugsweise umfaßt diese DNA-Sequenz eine der in Fig. 4 gezeigten DNA-Sequenzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit den biologischen Eigenschaften von MTR1 codiert und die sich von der vorstehenden DNA-Sequenz in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet; die mit den vorstehenden DNA-Sequenzen hybridisiert; die zu der DNA-Sequenz von Fig. 4 eine Homologie von mindestens 75%, vorzugsweise 85%, stärker bevorzugt 90% und am meisten bevorzugt 95% aufweist, oder die ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der vorstehenden DNA-Sequenzen ist.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff "hybridisieren" bezieht sich auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise auf Hybridisierungsbedingungen, bei denen als Lösung 5xSSPE, 1% SDS, 1xDen-

hardts-Lösung verwendet wird und/oder die Hybridisierungstemperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C liegen. Nach der Hybridisierung wird vorzugsweise zuerst mit 2×SSC, 1% SDS und danach mit 0,2×SSC bei Temperaturen zwischen 35°C und 70°C, vorzugsweise bei 65°C gewaschen (zur Definition von SSPE, SSC und Denhardts-Lösung siehe Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Besonders bevorzugt sind stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Begriffe "Variante" oder "Fragment" umfassen DNA-Sequenzen, die sich gegenüber den in Fig. 4 angegebenen Sequenzen durch Deletion(en), Insertion(en), Austausch(e) und/oder andere im Stand der Technik bekannte Modifikationen unterscheiden bzw. ein Fragment der ursprünglichen DNA-Sequenz umfassen, wobei das durch diese DNA-Sequenzen codierte Protein noch die biologischen Eigenschaften von MTR1 aufweist und biologisch aktiv ist. Dazu zählen auch Allelvarianten. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der DNA-Sequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., supra. Der Fachmann ist auch in der Lage, zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein noch über die biologischen Eigenschaften von MTR1 verfügt.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine DNA-Sequenz, die ein Protein (MTR1) oder ein Protein mit mindestens einer biologischen Eigenschaft von MTR1 codiert, wobei diese biologische Eigenschaft die Ca^{2+} -Regulation innerhalb der Zelle ist.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen sind für verschiedene Zwecke von Nutzen. So können sie, wie nachstehend näher beschrieben, zur rekombinanten Herstellung des MTR1-Proteins für Analysezwecke, zur weiteren Charakterisierung oder für therapeutische Zwecke verwendet werden. Sie können auch als Marker für Gewebe dienen, in denen das entsprechende Protein bevorzugt exprimiert wird (entweder konstitutiv oder während eines bestimmten Stadiums hinsichtlich der Gewebedifferenzierung, Entwicklung eines Krankheitsstadiums etc.). Darüber hinaus können sie auch als chromosomale Marker oder als "tags" zur Identifizierung von Chromosomen dienen bzw. zur Kartierung von verwandten Genen. Ferner können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen auch zum Vergleich mit endogenen DNA-Sequenzen von Patienten verwendet werden, um so potentielle genetische Erkrankungen identifizieren zu können. Sie können darüber hinaus als Hybridisierungs-Sonden zur Identifizierung neuer, verwandter DNA-Sequenzen dienen oder als Informationsquelle zur Entwicklung von PCR-Primern, beispielsweise für genetisches "fingerprinting". Schließlich können sie zur Auswahl und Herstellung von Oligonukleotiden zur Beschichtung eines "Genchips" oder eines anderen Trägers dienen, beispielsweise in Bezug auf das Studium von Expressionsmustern, zur Erzeugung von anti-Protein-Antikörpern, beispielsweise mittels DNA-Immunisierungsverfahren, und als Antigen zur Erzeugung von anti-DNA-Antikörpern oder zur Auslösung einer weiteren Immunantwort.

Durch die Erniedrigung oder Hemmung der Expression der vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, kann die Synthese von MTR1 bzw. verwandten Proteinen verringert oder eliminiert werden, was beispielsweise bei den vorstehend beschriebenen Krankheitszuständen wünschenswert sein kann. Daher betrifft eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Antisense-RNA, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie zu den vorstehenden DNA-Sequenzen komplementär ist und an die davon translatierte RNA spezifisch binden kann und die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten MTR1-Proteins oder des damit verwandten Proteins verringern oder hemmen kann, und ein Ribozym, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es zu den vorstehenden DNA-Sequenzen komplementär ist und an die von diesen DNA-Sequenzen transkribierte RNA spezifisch binden und diese spalten kann, wodurch die Synthese des von diesen DNA-Sequenzen codierten MTR1-Proteins ebenfalls verringert oder gehemmt wird. Vorzugsweise sind diese Antisense-RNAs und Ribozyme zu einer codierenden Region der mRNA komplementär. Der Fachmann ist in der Lage, ausgehend von den offenbarten DNA-Sequenzen, geeignete Antisense-RNAs herzustellen und anzuwenden. Geeignete Vorgehensweisen sind beispielsweise in EB-B1 0 223 399 oder EP-A1 0 458 beschrieben. Ribozyme sind RNA-Enzyme und bestehen aus einem einzelnen RNA-Strang. Diese können andere RNAs intermolekular spalten, beispielsweise die von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen transkribierten mRNAs. Diese Ribozyme müssen prinzipiell über zwei Domänen verfügen, (1) eine katalytische Domäne und, (2) eine Domäne, die zu der Ziel-RNA komplementär ist und an diese binden kann, was die Voraussetzung für eine Spaltung der Ziel-RNA ist. Ausgehend von in der Literatur beschriebenen Vorgehensweisen ist es inzwischen möglich, spezifische Ribozyme zu konstruieren, die eine gewünschte RNA an einer bestimmten, vorgewählten Stelle schneiden (siehe beispielsweise Tanner et al., in: *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Inc. (1993), 415-426). Vorzugsweise hybridisieren die vorstehenden Ribozyme oder Antisense-RNAs über einen Bereich von mindestens 15, mehr bevorzugt mindestens 25 und am meisten bevorzugt mindestens 50 Basen mit der von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen transkribierten RNA.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. die die vorstehend beschriebenen Antisense-RNAs oder Ribozyme codierenden DNAs können auch in einen Vektor bzw. Expressionsvektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese DNA-Sequenzen enthaltende Vektoren bzw. Expressionsvektoren. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (pUC18, pBR322, pBlueScript etc.), auf ein Virus oder ein anderes geeignetes Vehikel. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die deren Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryoten, beispielsweise E.coli, zählen der lac-, trp-Promotor, T3- oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryoten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe und der CMV-, SV40-, RVS-40-Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer für die Expression in tierischen Zellen. Weitere Beispiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Expressionsvektoren für E.coli zählen beispielsweise pGBMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, wobei letzterer bevorzugt ist. Zu den für die Expression in Hefe geeigneten Vektoren zählen pY100 und Ycpad1, für die Expression in Säugerzellen pMSXND, pKCR, pEFBOS, cDMB und pCEV4. Zu den erfindungsgemäßen Expressionsvektoren zählen auch von Baculovirus abgeleitete Vektoren für die Expression in Insektenzellen, beispielsweise pAcSGHisNTA.

Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid codierenden DNA inseriert werden, so daß die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen beispielsweise in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend beschriebenen Vektoren enthaltende Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen Bakterien (beispielsweise die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009), Hefe, vorzugsweise *S. cerevisiae*, Insektenzellen, vorzugsweise sf9-Zellen, und Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Bevorzugte Säugerzellen sind CHO-, VERO-, BHK-, HeLa-, COS-, MDCK, 293- und WI38-Zellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codiertes MTR1-Protein bzw. ein Protein mit dessen biologischer Aktivität sowie Verfahren zu deren rekombinanten Herstellung unter Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionsvektoren. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Kultivierung der vorstehend beschriebenen Wirtszellen unter Bedingungen, die die Expression des Proteins (bzw. Fusionsproteins) erlauben (vorzugsweise stabile Expression), und die Gewinnung des Proteins aus der Kultur oder aus den Wirtszellen. Dem Fachmann sind Bedingungen bekannt, transformierte bzw. transfigurierte Wirtszellen zu kultivieren. Geeignete Reinigungsverfahren (beispielsweise präparative Chromatographie, Affinitätschromatographie, beispielsweise Immunoaffinitätschromatographie, HPLC etc.) sind ebenfalls allgemein bekannt. Das erfindungsgemäße MTR1-Protein bzw. das damit verwandte Protein ist nicht nur bei den nachstehend beschriebenen therapeutischen Maßnahmen von Nutzen, sondern kann beispielsweise auch in biologischen Assays hinsichtlich einer Aktivitätsbestimmung Verwendung finden, beispielsweise in Kombination mit einer Reihe einer Vielzahl von weiteren Proteinen für ein "high-throughput"-Screenen. Darüber hinaus kann es zur Erzeugung von Antikörpern oder zur Erzeugung einer anderen Immunantwort nützlich sein, als Reagenz (beispielsweise in markierter Form) in kompetitiven Assays zur quantitativen Bestimmung des Proteins in biologischen Flüssigkeiten, als Marker für Gewebe, in denen das entsprechende Protein bevorzugt erzeugt wird (entweder konstitutiv oder während eines bestimmten Stadiums hinsichtlich der Gewebedifferenzierung, Entwicklung eines Krankheitsstadiums etc.), und natürlich zur Isolierung von interagierenden Proteinen, d. h. beispielsweise Proteinen, die an der Ca^{2+} -Ionenkanalbildung beteiligt sind. Schließlich kann das erfindungsgemäße MTR1-Protein bzw. das damit verwandte Protein auch zur Isolierung von Inhibitoren, Antagonisten oder Agonisten (beispielsweise hinsichtlich der Zusammenlagerung für die Ca^{2+} -Ionenkanalbildung) verwendet werden, wobei es sich beispielsweise um Peptide oder sonstige kleine Moleküle handeln kann.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft Liganden, beispielsweise Antikörper gegen die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Proteine (MTR1 oder verwandte Proteine). Diese Liganden können beispielsweise in diagnostischen Assays verwendet werden oder für therapeutische Zwecke, wobei es nach Aaslagerung an das Zielmolekül, d. h. MTR1, zu dessen Hemmung kommt. Verfahren zur Isolierung bzw. Synthese solcher Liganden sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise können möglicherweise nützliche aktivitätshemmende Verbindungen in Extrakten von natürlichen Produkten als Ausgangsmaterial gescreent werden. Solche Extrakte können beispielsweise aus Pilzen, Actinomyceten, Algen, Insekten, Protozoen, Pflanzen und Bakterien stammen.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Liganden um Antikörper oder Fragmente davon, die an das MTR1-Protein oder ein Protein mit dessen biologischer Aktivität spezifisch binden. Diese Antikörper können monoclonale, polyclonale oder synthetische Antikörper sein oder Fragmente davon. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff "Fragment" alle Teile des monoclonalen Antikörpers (z. B. Fab-, Fv- oder "single chain Fv"-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Antikörpern um monoclonale Antikörper. Die erfindungsgemäßen Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei vorzugsweise das von den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen codierte MTR1-Protein oder ein synthetisches Fragment davon als Immunogen dienen. Verfahren zur Gewinnung monoclonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der genannte monoclonale Antikörper ein aus einem Tier (z. B. Maus) stammender Antikörper, ein humanisierter Antikörper oder ein chimärer Antikörper oder ein Fragment davon. Chimäre, menschlichen Antikörper ähnelnde oder humanisierte Antikörper besitzen eine herabgesetzte potentielle Antigenität, jedoch ist ihre Affinität gegenüber dem Ziel nicht herabgesetzt. Die Herstellung von chimären und humanisierten Antikörpern bzw. von den menschlichen Antikörpern ähnelnden Antikörpern wurde ausführlich beschrieben (siehe beispielsweise Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 10029, und Verhoeven et al., Science 239 (1988), 1534). Humanisierte Immunglobuline weisen variable Grundgerüstbereiche auf, die im wesentlichen von einem humanen Immunglobulin stammen (mit der Bezeichnung Akzeptor-Immunglobulin) und die Komplementarität der determinierenden Bereiche, die im wesentlichen von einem nicht-menschlichen Immunglobulin (z. B. von der Maus) stammen (mit der Bezeichnung Donor-Immunglobulin). Die (der) konstante(n) Bereich(e) stammt (stammen), falls vorhanden, auch im wesentlichen von einem menschlichen Immunglobulin. Bei der Verabreichung an menschliche Patienten bieten humanisierte (sowie die menschlichen) Antikörper eine Reihe von Vorteilen gegenüber Antikörpern von Mäusen oder anderen Spezies: (a) das menschliche Immunsystem sollte das Grundgerüst oder den konstanten Bereich des humanisierten Antikörpers nicht als fremd erkennen und daher sollte die Antikörperantwort gegen einen solchen injizierten Antikörper geringer ausfallen als gegen einen vollständig fremden Maus-Antikörper oder einen partiell fremden chimären Antikörper; (b) da der Effektorbereich des humanisierten Antikörpers menschlich ist, interagiert er besser mit anderen Teilen des menschlichen Immunsystems, und (c) injizierte humanisierte Antikörper weisen eine Halbwertszeit auf, die im wesentlichen zu der von natürlich vorkommenden menschlichen Antikörpern äquivalent ist, was es erlaubt, kleinere und weniger häufige Dosen im Vergleich zu Antikörpern anderer Spezies zu verabreichen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können beispielsweise auch zur Immunpräzipitation des erfindungsgemäßen MTR1-Proteins, zur Isolierung verwandter Proteine aus cDNA-Expressionsbanken oder für diagnostische Zwecke (siehe unten) verwendet werden. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Hybridom, das den vorstehend beschriebenen monoclonalen Antikörper erzeugt.

Die vorliegende Erfindung erlaubt auch die Durchführung therapeutischer Maßnahmen bei den vorstehend diskutierten Erkrankungen, d. h. die vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, Antisense-RNAs, Ribozyme, Vektoren und Antikörper können auch zur Herstellung eines Arzneimittels, beispielsweise zur Kontrolle der Expression des MTR1-Proteins (oder des damit verwandten Proteins) oder zum Austausch einer mutierten Form des Gens gegen eine funktionelle Form verwendet werden, somit beispielsweise einerseits zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder der Behandlung von den vorstehend beschriebenen Erkrankungen, die offensichtlich mit einer veränderten Expression von MTR1 assoziiert sind, andererseits zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder der Behandlung von Erkrankungen, die beispielsweise mit einer fehlerhaften Regulation des Ca^{2+} -Eintritts in die Zellen assoziiert sind. Dies kann einerseits entweder eine Hemmung der Expression des MTR1-Gens (über Antisense-RNAs oder Ribozyme) oder eine Hemmung der Aktivität des MTR1-Proteins (beispielsweise mittels Antikörpern) andererseits eine Steigerung der Expression oder der Aktivität des Proteins (durch Applikation des Proteins selbst oder eines das Protein exprimierenden Vektors) erforderlich machen. Beispielsweise kann dazu das erfindungsgemäße MTR1-Protein in Säuger, insbesondere den Menschen, durch übliche Maßnahmen eingebracht werden. Hierzu kann es günstig sein, das Protein an ein vom jeweiligen Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z. B. Transferrin oder Rinderserumalbumin (BSA), zu koppeln. Auch kann eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz, Antisense-RNA oder Ribozym in Säuger, insbesondere den Menschen, eingebracht und exprimiert werden.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Arzneimittel, das die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen, Antisense-RNA, das Ribozym, den Expressionsvektor, die erfindungsgemäßen Proteine oder Antikörper enthält. Dieses Arzneimittel enthält gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphatgepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc. Die Verabreichung der Arzneimittel kann oral oder parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale oder intranasale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium der Erkrankung, der Art der Verabreichung etc.

Vorzugsweise werden die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen in einen für die Gentherapie geeigneten Vektor inseriert, beispielsweise unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, und in die Zellen eingeschleust. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der die vorstehend beschriebenen DNA-Sequenzen enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Retrovirus, Adenovirus, adenoassoziiertes Virus oder Vaccinia-Virus. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV.

Für Zwecke der Gentherapie können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen auch in Form von kolloidalen Dispersionen zu den Zielzellen transportiert werden. Dazu zählen beispielsweise Liposomen oder Lipoplexe (Mannino et al., Biotechniques 6 (1988), 682). Diese Gentherapie kann sowohl für die Erhöhung der MTR1-Expression (beispielsweise mit einem Vektor, der das Gen für aktives MTR1-Protein enthält), als auch für eine Verringerung der MTR1-Expression (beispielsweise mit einem Vektor, der ein Gen für ein Ribozym, eine Antisense-RNA oder eine inaktive Form von MTR1 ("knock-out") enthält) Anwendung finden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es auch, Störungen der MTR1-Expression auf genetischer Ebene zu untersuchen. Mit einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz bzw. davon abgeleiteten Sonden oder Primern kann in Säugern, insbesondere dem Menschen, festgestellt werden, ob sie ein verändertes MTR1-Gen enthalten, das zu einer mutierten Form des Proteins führt, die nicht länger biologisch aktiv ist, oder ob beispielsweise MTR1 zu gering oder zu stark exprimiert wird. Dazu kann der Fachmann übliche Verfahren, wie Reverse Transkription, PCR, RT-PCR, LCR, Hybridisierung und Sequenzierung durchführen. Auch die erfindungsgemäßen Antikörper oder Fragmente davon, eignen sich für die Diagnostik, d. h. beispielsweise zum Nachweis des Vorhandenseins und/oder der Konzentration des MTR1-Proteins, einer verkürzten oder verlängerten Form dieses Proteins etc., in einer Probe. Die Antikörper können beispielsweise in Immunoassays in Flüssigphase oder an einen festen Träger gebunden werden. Dabei können die Antikörper auf verschiedene Art und Weise markiert sein. Geeignete Marker und Markierungsverfahren sind auf dem Fachgebiet bekannt. Beispiele für Immungssays sind ELISA und RIA. Eine MTR1-Sonde kann auch zur Diagnostik von patUPD oder LOH geeignet sein, z. B. wenn a) ein geeigneter Polymorphismus auf DNA-Ebene vorhanden ist, der den parentalen Ursprung einer MTR1-Kopie klären kann oder b) eine monoallelische Expression generell vorliegt, womit dann auf RNA-Ebene ein LOH oder LOI nachweisbar ist.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Diagnoseverfahren zum Nachweis einer gestörten MTR1-Expression, bei dem man eine Probe mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz oder dem Antikörper oder einem Fragment davon in Berührung bringt und sodann direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die Konzentration, Länge und/oder Sequenz des MTR1-Proteins oder der dieses codierenden mRNA im Vergleich zu einer Kontrollprobe unterscheiden. Die für dieses Diagnoseverfahren verwendbaren Sonden umfassen auch auf den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen basierende Primer, beispielsweise für eine PCR.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung einen diagnostischen Kit zur Durchführung des vorstehend beschriebenen Diagnoseverfahrens, der eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder den vorstehend beschriebenen Antikörper oder das Fragment davon, enthält. Je nach Ausgestaltung des diagnostischen Kits können die DNA-Sequenz bzw. der Antikörper immobilisiert sein.

Von den Erfindern wurde ferner herausgefunden, daß eine Verbindung von MTR1 zur Apoptose besteht.

Fig. 1

Lokalisation von MTR1

Analysiert wurde der PAC-Klon pDJ915F1, der MTR1 enthält. Die Position des neuen Transkripts MTR1 in Relation zu weiteren Genen des Chromosoms 11 (Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an) sind angegeben.

Fig. 2

Genaue Exon/Intron-Übergänge des MTR1-Gens

Alle Exons (außer Exon 23A) korrelieren genau mit der AG-Exon-GT-Spleißregel für die Spleiß-Akzeptor/Spleiß-Donor-Stellen (Exon 23A: AG/GC). Das MTR1-Transkript besteht aus 24 Exons, wobei Teile des 5' und 3' nichttranslatierten Bereichs fehlen. Die durchschnittliche Größe der Exons beträgt 151 bp. Exon 19 konnte bisher nicht auf RNA-Ebene verifiziert werden.

Fig. 3

3A: Northern-Blot-Ergebnisse hinsichtlich der MTR1-RNA in fötalen Geweben und Geweben von Erwachsenen

Die RNA-Quellen sind über den Probenursprung angegeben. Die ungefähren Fragmentpositionen der Molekulargewichtsmarker sind ebenfalls angegeben. Der Pfeil zeigt das Hybridisierungssignal für MTR1 bei 4,5 kb. Starke Signale wurden in folgenden Geweben von Erwachsenen erhalten: Prostata, Hoden, Eierstock, Colon und Leukozyten des peripheren Bluts. Starke Signale wurden auch in fötalem Gehirn, Leber und Niere erhalten. In den meisten anderen Geweben wurden schwache Banden beobachtet. Zum Ausschluß von Kreuzhybridisierung mit verwandten Genen wurde eine Southern-Blot mit BglII-geschnittenen genomischen DNAs und BglII-geschnittenem genomischem pDJ915F1 unter identischen Bedingungen hybridisiert. In allen drei Spuren (rechts) wurden die gleichen Signale erhalten, somit handelt es sich um eine spezifische Hybridisierung ohne Anzeichen einer Kreuzhybridisierung.

3B: Ergebnisse der Hybridisierung der Northern-Blots mit RNAs aus verschiedenen Geweben

Es wurde die gleiche MTR1-Sonde wie in Fig. 3A verwendet. Starke Hybridisierungssignale wurden sowohl in Niere, Leber, Lunge, Dünnarm, Pankreas und Drüsengewebe von Erwachsenen als auch in fötaler Niere, Leber, Milz und Thymus beobachtet.

Fig. 4

MTR1-cDNAs und ORF

Es sind zwei alternative Spleißvarianten dargestellt. Die Spleißvariante 1 (kursiv) enthält Exon 18 und besitzt einen codierenden Bereich von 1165 Aminosäuren mit sechs Transmembran-Domänen (in Fettdruck), während bei Alternative 2 Exon 18 fehlt. Dies führt zu einem vorzeitigen Stop nach den ersten 872 Aminosäuren, wobei nur die ersten vier Transmembran-Domänen umfaßt werden. Die Position von Exon 18 wird von "-/-" Zeichen flankiert. Eine ideale "Kozak consensus"-Sequenz ist oben am Beginn des ORF angegeben. Lediglich das Nucleotid an der letzten Position von MTR1 unterscheidet sich von der idealen "Kozak"-Sequenz (ATGC anstelle von ATGG), was jedoch trotzdem zu einer funktionellen Initiation der Translation führt.

Fig. 5

5A: Hybridisierungssignale auf einem Southern-Blot mit DNAs der Zelllinie GM

GM-Zelllinien enthalten nur den mütterlichen (7300, 13400) oder väterlichen (11941, 11944, 1927B) Bereich von 11p15.5 (in einem Nagerhintergrund). Mütterliche Hybridisierungssignale sind bei 2,4 kb, väterliche bei 2,7 kb, was die Beibehaltung des Epigenesis-Chromatinstadiums in den fünf GM-Zelllinien zeigt.

5B: RT-PCR-Produkte aus GM-Zelllinien

Zur Verhinderung der Amplifikation auf der genomischen Ebene wurden RT-Reaktionen, wie in Beispiel 1 beschrieben, durchgeführt. Zur Verifizierung einer spezifischen Amplifikation wurden die Produkte sequenziert. Der obere Abschnitt zeigt RT-PCR-Produkte eines Teils der codierenden Region von NAP114 (siehe auch Fig. 1) in allen fünf somatischen Zellhybriden, was die Beibehaltung von 11p15.5 und die Transkription von biallelisch transkribierten Genen darin zeigt (Kontrolle). Der untere Abschnitt zeigt die Amplifikation von MTR1-Produkten bei zwei der drei väterlichen Hybride (GM11927B, GM11944). Die Hybridisierung des geblotteten Gels mit einer MTR1-Sonde ergab auch ein schwaches Signal in GM11941 (nicht gezeigt), was eine lediglich väterliche Expression in MTR1 anzeigt.

Fig. 6

Hybridisierungssignale mit einer MTR1-Sonde auf einem Northern-Dotblot mit 47 (alle heterogenen Wilms-Tumor-Gewebetypen repräsentierenden) Wilms-Tumoren und 4 nichterkrankten Nieren-Geweben

Alle WT wurden hinsichtlich WT1-Mutationen getestet. Das Beladungsschema für den Dotblot ist in der Mitte dargestellt. Jede Position enthält 2 µg Gesamt-RNA. Zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung mit jeder Probe wurde eine Hybridisierung mit einer 28S-RNA-Sonde durchgeführt (oben). Zum Ausschluß von Hybridisierungssignalen auf der DNA-Ebene wurden vier DNA-Sonden (1–25 ng) ebenfalls auf die Filter aufgetupft (Positionen E6–E9). In einer Reihe von WT wurden starke Signale beobachtet (Positionen A5, 7, 9–12, B1, 9, C4, 5, 7, 8 und D3–6, 7). Im Durchschnitt waren die erhaltenen Signale höher als in normalem Gewebe. Die Signale wurden nach dem Zufallsprinzip mittels RT-PCR der Tumorproben bestätigt. Keine der WT-Zelllinien (WT128c1, WCCS Position B11–12) zeigten in der RT-PCR ein Signal. Wt188 und Wt128cl haben eine LOH für 11p und zeigen keine oder nur eine schwache Transkription von MTR1. Wt127 (Wt127 und Wt128cl besitzen eine WT1-Mutation) zeigen nur mäßige Mengen an MTR1-Transkripten.

Fig. 7

Zweifarbige FISH-Analyse von Metaphase-Spreitungen von der rhabdoiden Tumorzelllinie TM87-16

Rote Signale entsprechendem Chromosom 11 alpha-Satelliten und grüne Signale dem genomischen MTR1-Bereich einschließlich des vermuteten Promotorbereichs am 5'-Ende von MTR1. Die Zelllinie zeigt eine reziproke Translokation (t(11; 22)(p15.5; q11.23)), wobei die Chromosom 11-Bruchstelle in dem genomischen Bereich liegt, der von dem PAC-Clon pDJ915F1 umspannt wird, derselbe Clon, der MTR1 enthält. Hybridisierungssignale wurden nur mit dem intakten Chromosom 11 und dem veränderten Chromosom 22 beobachtet, was eine vollständige Translokation von MTR1 auf das dadurch veränderte Chromosom 22 ohne Unterbrechung des Gens zeigt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Allgemeine Verfahren

(A) RT-PCR-Analyse

2 µg Gesamt-RNA wurden nach Spaltung mit DNase I mittels 250 pmol oligo(dT)-Primern und 300 E MMLV-Reverse-Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 40 µl revers transkribiert. 2 µl dieses Reaktionsgemischs wurden in einer 20 µl PCR-Reaktion unter Verwendung der folgenden Genspezifischen Primer analysiert: MTR1E15F (5'-GTGCTGTCTTCCTGCTCAC-3'), MTR1E16R (5'-TGACACCCACGATGAACAGG-3'), MTR1E17F (5'-GGACTTCATGGTGTTCACGC-3'), MTR1E21R (5'-CGTGGTACTCCACAATCAGG-3'), MTR1E1F (5'-CCATGCAGGATGTCCAAGGC-3') und MTR1E24R (5'-TCAGGCAACACAAGTCAGG-3') [Anmerkung zur Namensgebung: z. B. MTR1E21R = stammt aus der cDNA von MTR1 aus dem durchnummerierten Exon 21, in der in der cDNA aufgelisteten Basenfolge (F) oder dazu revers komplementär (R)]. Die Primerpaare MTR1E15F, MTR1E16R und MTR1E17F und MTR1E21R wurden zum Nachweis der Transkription des MTR1-Gens in revers transkribierter mRNA unter folgenden PCR-Bedingungen verwendet: Einleitende Denaturierung (3 min. 94°C), 35 Zyklen (Denaturierung: 1 min. 94°C; Primeranlagerung: 1 min. 58°C; Primerverlängerung: 1 min. 72°C) und ein abschließender "Polishing"-Schritt (7 min. 72°C), 1,5 mM MgCl₂, 25 µmol von jedem Primer und 5 E Taq-Polymerase. Die Primerpaare MTR1E1F, MTR1E16R und MTR1E15F, MTR1E24R wurden zur Amplifikation des vollständigen offenen Leserahmens in zwei überlappenden Fragmenten verwendet, wobei das "ExpandTM PCR System" entsprechend den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Roche Diagnostics, früher: Boehringer Mannheim, Deutschland) verwendet wurde.

(B) Southern- und Northern-Analysen

Genomische DNA und Gesamt-RNA wurden nach Standard-Verfahren (Proteinase K/Phenol-Behandlung und Verwendung von "RNeasy"-Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland)) präpariert. Für Southern-Blots wurden 10 µg genomische DNA mit den erforderlichen Mengen der jeweiligen Restriktionsendonuclease vollständig gespalten und danach auf einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde die DNA mit 0,25 M HCl depuriniert und 30 min mit 0,5 N NaOH/ 1,5 M NaCl denaturiert. Der Transfer von DNA-Fragmenten und RNA auf "Hybond N+"-Membranen (Amersham, Braunschweig) erfolgte in 10xSSC für 48 Stunden, danach erfolgte eine W-Quervernetzung. Northern-Dotblots wurden durch das Auftropfen von jeweils 2 µg Gesamt-RNA in einer symmetrischen Anordnung auf eine Nylon-Membran (Hybond N+, Amersham), an das sich eine W-Quervernetzung anschloß, hergestellt. Außerdem wurden für eine ausführlichere Analyse der MTR1-Expression Northern-Blots mit RNAs aus einer Reihe von verschiedenen menschlichen fötalen Geweben (Clontech, Palo Alto, CA, USA) verwendet. Komplementäre DNA-Sonden des MTR1-Gens wurden mittels PCR amplifiziert und mit dem "Qiaquick"-Gelextraktions-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers Gel-gereinigt und mit 32P unter Verwendung eines Standard-Protokolls für "nick-translation" radioaktiv markiert.

Die Hybridisierung aller Blots erfolgte 1 bis 2 Stunden bei 68°C in einer "ExpresshybTM"-Lösung (Clontech, Palo Alto, CA, USA) unter Verwendung von 2 × 10⁶ cpm/ml Sonde. Die Waschschrte nach der Hybridisierung erfolgten gemäß den Vorschlägen des Herstellers der "ExpresshybTM"-Lösung (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Die Autoradiographie wurde 16 bis 120 Stunden mit Verstärkerfolien bei -80°C durchgeführt.

(C) Zelllinien

Somatische Zellhybride, die ein väterliches (GM10927B, GM1944, GM11941) oder mütterliches Chromosom 11 (GM07300, GM13400) in einem Nager-Hintergrund enthielten, wurden wie kürzlich beschrieben gehalten (Gabriel et al., PNAS 95 (1998), 14857–14862). Die rhabdoide Zelllinie TM87-16 (Karnes et al., Genet. Cytogenet. 56 (1991), 31–38) wurde in DMEM gehalten, das mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), Pen/Strep und Glutamin supplementiert war.

(D) Bestimmung der allelen Expression

cDNAs der somatischen Zellhybride, die entweder das väterliche oder mütterliche Chromosom 11 enthielten, wurden mittels der in (A) vorstehend beschriebenen Primer und Amplifikationsprotokolle amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf 2% Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Membran wie in (B) vorstehend beschrieben transferiert. Produkte wurden durch Hybridisierung mit einer 32P-markierten cDNA-Sonde verifiziert und ein PCR-Produkt wurde direkt sequenziert. Für alle Primersätze wurden Kontrollamplifikationen hinsichtlich möglicher Kontaminationen unter identischen PCR-Bedingungen durchgeführt, allerdings ohne reverse Transkription der präparierten RNA.

(E) FISH-Analyse

Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) an Metaphase-Chromosomen wurde wie kürzlich beschrieben durchgeführt (Spangenberg et al., Genomics 48 (1998), 178–185; Winterpacht et al., Cytogenetics and Cell Genetics 75/2–3/96 (1996), 132–135). Metaphase-Spreitungen von TM87-16-Zellen wurden wie kürzlich beschrieben durchgeführt (Löbber et al., Genes Chromosomes Cancer 21 (1998), 347–350; Spangenberg et al., Genomics 48 (1998), 178–185; Winterpacht et al., Cytogenetics and Cell Genetics 75/2–3/96 (1996), 132–135). Genomische; das MTR1-Gen umfassende Fragmente wurden mit flankierenden Primern mittels des "ExpandTM"-PCR-Systems (Roche Diagnostics, früher: Boehringer Mannheim, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers amplifiziert. Diese Fragmente wurden mit "DIG-11"-dUTP entsprechend Boehringer Mannheim-Protokollen "nick-translatiert" und über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer hybridisiert. Die Waschschriffe nach der Hybridisierung wurden bei 42°C in 50% Formamid, 1 x SSC dreimal jeweils 5 min und in 0,3 x SSC dreimal jeweils 5 min durchgeführt. Der immunologische Nachweis der hybridisierten Sequenzen wurde mittels eines Maus-anti-DIG-Antikörpers (Boehringer Mannheim, Deutschland) durchgeführt, der 1 : 1000 in 4 x SSC, 0,1% Tween 20 verdünnt worden war und "TRITC"-markiertem anti-Maus-IgG aus Kaninchen (Boehringer Mannheim, Deutschland), des 1 : 100 verdünnt worden war. Es schloß sich eine Signalamplifikation mit "TRITC"-markiertem 1 : 64 verdünnten anti-Kaninchen-IgG (Boehringer Mannheim, Deutschland) an. Chromosomen wurden mit 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt und mit "VectashieldTM" (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bedeckt. Die FISH wurde mittels einer Hochleistungs-CCD-Kamera (Applied Imaging, Santa Clara, CA, USA) aufgenommen und mit der "Cytovision 2.21"-Software (Applied Imaging, Santa Clara, CA, USA) ausgewertet.

(F) Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Proteins MTR1

Die DNA von Fig. 4 (ohne Exon 18) wird mit BamHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/MRT erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen [um Exon 18 verkürzten] MRT1-Protein von Fig. 4 (C-Terminuspartner). pQE-8/MRT wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesuran, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265–273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau anfärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J. Mol.Biol. 149 (1975), 709–733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

(G) Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein gemäß vorstehendem Abschnitt (F) wird einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 97 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

a) Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)

Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von vorstehendem Abschnitt (F) einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1 : 10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1 : 5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 µM 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

b) Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

c) Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)

Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Beispiel 2

Transkripte, alternatives Spleißen und genomische Struktur von MTR1

Die Analyse der genomischen MTR1-Teilregion ergab 24, den ORF (Größe etwa 3,9 kb) umfassende Exons und eine Gesamtlänge von 18,5 kb. Die Lokalisation von MTR1 ist proximal zu TSSC4 und distal zum ersten 5'-Exon des KvLQT1-Gens. Somit liegt das neue Gen innerhalb von BWSCR1 auf Chromosom 11. Um direkt nachzuweisen, daß die vorhergesagten Exons in mRNA transkribiert werden, wurde zur Amplifikation von überlappenden Genbereichen "Exon-Verbindungs"-Experimente durchgeführt. Da BWSCR1 sowohl an BWS als auch WT's beteiligt ist, wurden cDNA von humanen fötalen Nieren und Nieren von Erwachsenen erzeugt. Da die Amplifikationsprodukte Introns umfaßten, konnten von transkribierten Sequenzen stammende PCR-Produkte von PCR-Produkten aus nicht-transkribierter genomischer DNA unterschieden werden. Der Minimalsatz an Primern, der für die Abdeckung des MTR1-ORF notwendig war, waren MTR1E1F/MTR1E16R und MTR1E15R/MTR1E24R. Mit reverser Transkription gekoppelte PCR-Reaktionen (RT-PCR) von RNA-Präparationen aus fötalen Nieren und Nieren von Erwachsenen ergab Produkte mit der erwarteten Größe. Die PCR-Produkte wurden subkloniert und beide Stränge sequenziert. Nur ein Exon (Exon 19) konnte bisher nicht identifiziert werden. Jedoch konnte ein zusätzliches Exon reproduzierbar in dem RT-PCR-Produkt nachgewiesen werden (Exon 23A). Außerdem erzeugte das Primerpaar MTR1E15F/MTR1E24R zwei PCR-Produkte aus der verwendeten cDNA, die sich in einem Exon (Exon 18) unterschieden. Man kann daher davon ausgehen, daß dieses Exon einem alternativen Spleißen unterliegt. Mittels des Vergleichs der genomischen Sequenz mit dem MTR1-Transkript konnten die genauen Exon/Intron-Grenzen des MTR1-Gens bestimmt werden (Fig. 2).

Beispiel 3

Expression des MTR1-Gens

Die Amplifikationsprodukte des Primerpaares MTR1E15R/MTR1E24R wurden gelgereinigt und zur Bestimmung des Expressionsprofils und der Transkriptgröße des MTR1-Gens auf Northern-Blots mit RNAs aus unterschiedlichen Geweben (MTN) verwendet. Um Kreuzhybridisierung mit Genen aus der TRP-Genfamilie ausschließen zu können, wurden Southern-Blots mit geschnittener genomischer DNA und genomischem pDJ915F1 (genomischer PAC-Klon; erhältlich

von Ressourcenzentrum des Dt. Humangenomprojekts (RZPD), Berlin) unter identischen Bedingungen hybridisiert. In den Southern-Blots wurden sowohl in den genomischen DNA-Fragmenten als auch in den Fragmenten des PAC-Klons identische Signale erhalten. Somit war die Hybridisierung spezifisch und es zeigte sich kein Hinweis auf eine Kreuzhybridisierung. Ein 4,5 kb Transkript konnte in einer Reihe von fötalen und erwachsenen Geweben nachgewiesen werden (Fig. 3A). Da die experimentell bestätigten Exons nur 3913 bp umfassen, deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß etwa 500 bp nicht-translatierter mRNA noch zu identifizieren sind. Auf Northern-Blots zeigt das MTR1-Gen eine signifikante Expression in fötaler Leber, Niere und Milz sowie in Niere, Leber, Dünndarm, Lunge, Pankreas, Colon, Prostata und Drüsengewebe von Erwachsenen (Fig. 3B). Dieses Ergebnis zeigt somit, daß MTR1 in einer großen Zahl von Geweben exprimiert wird. Da sich die beiden vermeintlichen Spleißformen von MTR1 nur in Exon 18 (175 bp) unterscheiden, können diese beiden Transkripte auf Northern-Blots nicht unterschieden werden.

Beispiel 4

Proteinstruktur

Aufgrund des alternativ gespleißten Exons 18 kann man von wenigstens zwei Isoformen ausgehen. Exon 1 enthält eine fast ideale "Kozak-consensus"-Sequenz, was nahelegt, daß die Initiation der Translation an dieser Position einsetzt. Der längste ORF mit diesem Initiationscodon (einschließlich Exon 18) umfaßt 3495 bp, die ein Polypeptid mit 1165 Aminosäuren codieren und 6 Transmembrandomänen enthält (Fig. 4). Das theoretische Molekulargewicht ist 131,45 kDa. Die zweite Spleißversion kodiert einen kleineren ORF mit 872 Aminosäuren (Fig. 4). Dieses Protein hat die ersten 869 Aminosäuren mit der längeren MTR1-Version gemeinsam, besteht somit aus 4–5 Transmembran-Domänen. Das theoretische Molekulargewicht beträgt 97,74 kDa. Es wurde gefunden, daß die MTR1-Proteine in der Plasmamembran lokalisiert sind, wobei der C-Terminus innerhalb der Zelle liegt.

Beispiel 5

Väterliche Expression von MTR1-mRNA

Wie bereits kürzlich beschrieben, wird die bevorzugte monoallelische Expression "imprinted Gene" (= ein Gen wird nur von einem der parentalen Allele transkribiert, wobei das von dem zweiten Elternteil stammende Allel durch DNA-Modifikationen, z. B. Methylierungen, stillgelegt ist) in somatischen, ein einzelnes humanes Chromosom 11 enthaltenen Zellhybriden aufrechterhalten (Gabriel et al., PNAS 95 (1998), 14857–14862; Mitsuya et al., Hum. Mol. Genet. 8 (1999), 1209–1217). Dies ermöglicht die Verwendung von Zellhybriden, die entweder einen vom Vater oder der Mutter stammenden humanen chromosomalen 11p15-Bereich enthalten, als Modellsystem zur Identifizierung "geprägter" Gene aus dem BWSCR1-Bereich.

Die Expression des MTR1-Gens wurde mittels RT-PCR in einem Teilsatz der somatischen Zellhybride durchgeführt, die kürzlich von Gabriel et al. (PNAS 95 (1998), 14857–14862) beschrieben worden waren. Zu diesen zählten zwei Zelllinien mit einem von der mütterlichen Seite stammenden humanen Chromosom 11 (GM7300, GM13400) und drei somatische Zellhybride mit einer väterlichen Kopie von 11p15 (GM10927B, GM11944, GM11941). Zur Überprüfung der Beibehaltung der epigenetischen Chromatinstadien wurden die Hybride hinsichtlich einer unterschiedlichen Methylierung an einer kürzlich beschriebenen mütterlich methylierten NotI-Restriktionsstelle innerhalb des KvQT1-Genbereichs (Gabriel et al., PNAS 95 (1998), 14857–14862; Mitsuya et al., Hum. Mol. Genet. 8 (1999), 1209–1217; Smilnich et al., PNAS 96 (1999), 8064–8069) analysiert. Alle untersuchten Zellhybride zeigten die Methylierung entsprechend ihrer väterlichen Herkunft (Fig. 5A, mütterliches Hybridisierungssignal bei 4,2 kb, väterliches bei 2,7 kb), wodurch die erwarteten Epigenesis-Chromatinstadien bestätigt wurden. Zur Verifizierung der Integrität der 11p15.5-Transkripte wurden die Zellhybride hinsichtlich der Anwesenheit eines codierenden Fragments von NAP1L4 (= Nucleosome-assemblyprotein 1 like gene No. 4 aus 11p15.5, welches biallelisch transkribiert wird) als ein bi-allelisches Transkript untersucht. Fig. 5B zeigt die für das vorstehend erwähnte Genfragment erhaltenen RT-PCR-Produkte, d. h. zeigt die Anwesenheit von 11p15.5 in den untersuchten Hybriden.

Die drei, das von der väterlichen Seite stammende Chromosom 11 enthaltenden somatischen Zellhybride zeigten ein MTR1-RT-PCR-Produkt (GM11941 nur im Anschluß an Southern-Blot-Hybridisierung), während bei Hybriden, die eine mütterliche Kopie von Chromosom 11 enthielten, keine Produkte gefunden werden konnten. Der Befund, daß die in diesem Produkt erhaltenen PCR-Produkte von MTR1 stammten, wurde durch Hybridisierung des geblotteten Gels mit einer radioaktiv markierten MTR1-Sonde und durch direkte Sequenzierung eines der PCR-Produkte bestätigt. Die Daten ergaben, daß das MTR1-Gen (bevorzugt) väterliche Expression zeigt.

Beispiel 6

Expression des MTR1-Gens in Tumoren

Etwa 5–15% von Wilms Tumoren (WT) beruhen auf Mutationen innerhalb des Wilm-Tumor-Gens 1 (WT1), das auf dem chromosomalen Bereich 11p13 lokalisiert ist und einen einen Zinkfinger enthaltenden Transkriptionsfaktor kodiert. WT sind heterogen mit variablem Gehalt an blastemischem, stromalem oder epithelalem Gewebe. Es wurde daher eine repräsentative Anzahl von 47 WT ausgewählt, einschließlich von zwei Fällen mit LOH auf Chromosom 11p (WT128cl, WT188) und zwei WT-Zelllinien (WT128cl, WCCS). Jeder Tumor wurde histologisch charakterisiert und hinsichtlich WT1-Mutationen analysiert. WT128 und WT127 waren die einzigen WT, die eine Mutation in WT1 hatten (WT128 mit einem vorzeitigen Stopcodon, veröffentlicht in Loeber et al., Genes Chromosomes Cancer 21 (1998), 347–350; WT127 mit einem vorzeitigen Stopcodon in Zinkfinger 2 (Exon 8)). Gleiche Mengen an Gesamt-RNA (2 µg) aus 47 Tu-

moren, 5 nicht betroffenen Kontrollgeweben (fötale Niere und Niere von Erwachsenen) und 4 DNA-Sonden mit unterschiedlichen Konzentrationen (1–25 ng) wurden zur Herstellung eines RNA-Dotblots verwendet. Nach Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten MTR1 cDNA-Fragment konnten in beinahe allen WT-Proben Signale in unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden. Durchschnittlich waren die Signale im Vergleich zu denen in den normalen Geweben höher. Hybridisierungssignale wurden nach dem Zufallsprinzip mittels RT-PCR an den Tumor-Proben mit den Primerpaaren MTR1E115F/MTR1E16R und MTR1E17F/MTR1E21R bestätigt. Das letztere Primerpaar umspannt das alternativ gespleißte Exon 18. Alle RT-PCR-Reaktionen, die mit diesen Primern eine Amplifikation ergaben, zeigten beide Spleißversionen von MTR1. Beide WT-Zelllinien zeigten kein MTR1-Signal nach Hybridisierung oder nach Analyse der RNA mittels RT-PCR. Außerdem wurden drei Tumor-Proben von BWS-Patienten (ohne WT1-Mutation) analysiert, die geringe Mengen des MTR1-Transkripts zeigten.

Da Veränderungen in 11p15.5, insbesondere in BWSCR1, nicht nur eine Korrelation mit der Entwicklung mit Rhabdomyosarkomen zeigen (Karnik et al., Hum. Mol. Genet. 7 (1998), 895–903), wurden Gewebeproben von drei Rhabdomyosarkomen in die Untersuchung miteinbezogen. RT-PCR mit den vorstehend erwähnten Primerpaaren ergab Amplifikation, was darauf hinweist, daß MTR1 auch in diesem Tumortyp exprimiert wird.

Beispiel 7

Translokation des MTR1-Gens in einem rhabdoiden Tumor (TM87-16)

Maligne rhabdoide Tumore (MRT) gehören zu der Tumorgruppe von Sarkomen der Weichteile und sind außerordentlich aggressiv mit einem hohen metastatischen Potential. Es wurde zuerst davon ausgegangen, daß es sich dabei um Wilms-Tumor-Varianten handelt, da sie jedoch an zahlreichen Stellen außerhalb des Nierengewebes beobachtet wurden, geht man inzwischen davon aus, daß es sich um einen anderen Tumortyp handelt. Karnes et al. (Cancer Genet. Cytogenet. 56 (1991), 31–38) etablierten eine Zelllinie (TM87-16) aus einem Pleuraerguß einer retroperitonealen Masse, der in einem 21 Monate alten männlichen Kaukasier diagnostiziert worden war. Die Chromosomenanalyse ergab eine reziproke Translokation t(11; 22)(p15.5; q11.23), deren Bruchstelle in der von dem PAC-Clon pDJ915F1 (der MTR1 enthält) umspannten genomischen Region lokalisiert ist. Da die genaue Bruchstelle noch nicht bestimmt worden war, wurden genomische Fragmente von MTR1 amplifiziert und danach in einer FISH-Analyse an TM87-16 Metaphase-Spreitungen verwendet. Das FISH-Experiment zeigte, daß MTR1 ohne Unterbrechung auf das Chromosom 22 transloziert worden war (Fig. 7). Somit ist die Translokations-Bruchstelle in TM87-16 proximal zu MTR1. Die RT-PCR-Analyse von Gesamt-RNA aus TM87-16 mit den Primern MTR1E15F/MTR1E16R zeigte eine mäßige Expression des MTR1-Gens.

Folgende Klone wurden bei der DSMZ (Deutsches Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig) am 19. Oktober 1999 gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

E. coli MTR1-17/21 DSM 13108

E. coli MTR1-1/24 DSM 13107

MTR1-17/21 beinhaltet die Exons 17–21 inkl. dem alternativ gespleißten 18 des Gens MTR1. MTR-1/24 beinhaltet die Exons 1 bis 24 (inkl.) ohne das Exon 18 des MTR1-Gens (gesamter ORF).

DE 199 53 167 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

5 <120> Mit TRP-Proteinen verwandtes Protein MTR1 und dieses codierende DNA-Sequenz

<130> P 3046

<140> DE 199 53 167.6

10 <141> 1999-11-04

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 3913

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (10) ... (3504)

25

<400> 1

```

gaggccacc atg cag gat gtc caa ggc ccc cgt ccc gga agc ccc ggg      48
      Met Gln Asp Val Gln Gly Pro Arg Pro Gly Ser Pro Gly
          1              5              10

30 gat gct gaa gac cgg cgg gag ctg ggc ttg cac agg ggc gag gtc aac      96
   Asp Ala Glu Asp Arg Arg Glu Leu Gly Leu His Arg Gly Glu Val Asn
      15              20              25

   ttt gga ggg tct ggg aag aag cga ggc aag ttt gta cgg gtg ccg agc      144
35 Phe Gly Gly Ser Gly Lys Lys Arg Gly Lys Phe Val Arg Val Pro Ser
   30              35              40              45

   gga gtg gcc ccg tct gtg ctc ttt gac ctg ctg ctt gct gag tgg cac      192
40 Gly Val Ala Pro Ser Val Leu Phe Asp Leu Leu Leu Ala Glu Trp His
      50              55              60

   ctg ccg gcc ccc aac ctg gtg gtg tcc ctg gtg ggt gag gag cag cct      240
   Leu Pro Ala Pro Asn Leu Val Val Ser Leu Val Gly Glu Glu Gln Pro
      65              70              75

45 ttc gcc atg aag tcc tgg ctg cgg gat gtg ctg cgc aag ggg ctg gtg      288
   Phe Ala Met Lys Ser Trp Leu Arg Asp Val Leu Arg Lys Gly Leu Val
      80              85              90

   aag gcg gct cag agc aca gga gcc tgg atc ctg acc agt gcc ctc cgc      336
50 Lys Ala Ala Gln Ser Thr Gly Ala Trp Ile Leu Thr Ser Ala Leu Arg
      95              100              105

   gtg ggc ctg gcc agg cat gtc ggg cag gcc gtg cgc gac cac tcg ctg      384
55 Val Gly Leu Ala Arg His Val Gly Gln Ala Val Arg Asp His Ser Leu
   110              115              120              125

   gcc agc acg tcc acc aag gtc cgt gtg gtt gct gtc ggc atg gcc tcg      432
   Ala Ser Thr Ser Thr Lys Val Arg Val Val Ala Val Gly Met Ala Ser
      130              135              140

60 ctg ggc cgc gtc ctg cac cgc cgc att ctg gag gag gcc cag gag gat      480
   Leu Gly Arg Val Leu His Arg Arg Ile Leu Glu Glu Ala Gln Glu Asp
      145              150              155

```

65

DE 199 53 167 A 1

ttt cct gtc cac tac cct gag gat gac ggc ggc agc cag ggc ccc ctc Phe Pro Val His Tyr Pro Glu Asp Asp Gly Gly Ser Gln Gly Pro Leu 160 165 170	528	
tgt tca ctg gac agc aac ctc tcc cac ttc atc ctg gtg gag cca ggc Cys Ser Leu Asp Ser Asn Leu Ser His Phe Ile Leu Val Glu Pro Gly 175 180 185	576	5
ccc ccg ggg aag ggc gat ggg ctg acg gag ctg cgg ctg agg ctg gag Pro Pro Gly Lys Gly Asp Gly Leu Thr Glu Leu Arg Leu Arg Leu Glu 190 195 200 205	624	10
aag cac atc tcg gag cag agg gcg ggc tac ggg ggc act ggc agc atc Lys His Ile Ser Glu Gln Arg Ala Gly Tyr Gly Gly Thr Gly Ser Ile 210 215 220	672	15
gag atc cct gtc ctc tgc ttg ctg gtc aat ggt gat ccc aac acc ttg Glu Ile Pro Val Leu Cys Leu Leu Val Asn Gly Asp Pro Asn Thr Leu 225 230 235	720	
gag agg atc tcc agg gcc gtg gag cag gct gcc ccg tgg ctg atc ctg Glu Arg Ile Ser Arg Ala Val Glu Gln Ala Ala Pro Trp Leu Ile Leu 240 245 250	768	20
gta ggc tcg ggg ggc atc gcc gat gtg ctt gct gcc cta gtg aac cag Val Gly Ser Gly Gly Ile Ala Asp Val Leu Ala Leu Val Asn Gln 255 260 265	816	25
ccc cac ctc ctg gtg ccc aag gtg gcc gag aag cag ttt aag gag aag Pro His Leu Leu Val Pro Lys Val Ala Glu Lys Gln Phe Lys Glu Lys 270 275 280 285	864	30
ttc ccc agc aag cat ttc tct tgg gag gac atc gtg cgc tgg acc aag Phe Pro Ser Lys His Phe Ser Trp Glu Asp Ile Val Arg Trp Thr Lys 290 295 300	912	
ctg ctg cag aac atc acc tca cac cag cac ctg ctc acc gtg tat gac Leu Leu Gln Asn Ile Thr Ser His Gln His Leu Leu Thr Val Tyr Asp 305 310 315	960	35
ttc gag cag gag ggc tcc gag gag ctg gac acg gtc atc ctg aag gcg Phe Glu Gln Glu Gly Ser Glu Glu Leu Asp Thr Val Ile Leu Lys Ala 320 325 330	1008	40
ctg gtg aaa gcc tgc aag agc cac agc cag gag cct cag gac tat ctg Leu Val Lys Ala Cys Lys Ser His Ser Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Leu 335 340 345	1056	45
gat gag ctc aag ctg gcc gtg gcc tgg gac cgc gtg gac atc gcc aag Asp Glu Leu Lys Leu Ala Val Ala Trp Asp Arg Val Asp Ile Ala Lys 350 355 360 365	1104	50
agt gag atc ttc aat ggg gac gtg gag tgg aag tcc tgt gac ctg gag Ser Glu Ile Phe Asn Gly Asp Val Glu Trp Lys Ser Cys Asp Leu Glu 370 375 380	1152	
gag gtg atg gtg gac gcc ctg gtc agc aac aag ccc gag ttt gtg cgc Glu Val Met Val Asp Ala Leu Val Ser Asn Lys Pro Glu Phe Val Arg 385 390 395	1200	55
ctc ttt gtg gac aac ggc gca gac gtg gcc gac ttc ctg acg tat ggg Leu Phe Val Asp Asn Gly Ala Asp Val Ala Asp Phe Leu Thr Tyr Gly 400 405 410	1248	60

65

DE 199 53 167 A 1

	cgg ctg cag gag ctc tac cgc tcc gtg tca cgc aag agc ctg ctc ttc	1296
	Arg Leu Gln Glu Leu Tyr Arg Ser Val Ser Arg Lys Ser Leu Leu Phe	
	415 420 425	
5		
	gac ctg ctg cag cgg aag cag gag gag gcc cgg ctg acg ctg gcc ggc	1344
	Asp Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Glu Ala Arg Leu Thr Leu Ala Gly	
	430 435 440 445	
10	ctg ggc acc cag cag gcc cgg gag cca ccc gcg ggg cca ccg gcc ttc	1392
	Leu Gly Thr Gln Ala Arg Glu Pro Pro Ala Gly Pro Pro Ala Phe	
	450 455 460	
	tcc ctg cac gag gtc tcc cgc gta ctc aag gac ttc ctg cag gac gcc	1440
15	Ser Leu His Glu Val Ser Arg Val Leu Lys Asp Phe Leu Gln Asp Ala	
	465 470 475	
	tgc cga ggc ttc tac cag gac ggc cgg cca ggg gac cgc agg agg gcg	1488
	Cys Arg Gly Phe Tyr Gln Asp Gly Arg Pro Gly Asp Arg Arg Ala	
	480 485 490	
20		
	gag aag ggc ccg gcc aag cgg ccc acg ggc cag aag tgg ctg ctg gac	1536
	Glu Lys Gly Pro Ala Lys Arg Pro Thr Gly Gln Lys Trp Leu Leu Asp	
	495 500 505	
25	ctg aac cag aag agc gag aac ccc tgg cgg gac ctg ttc ctg tgg gcc	1584
	Leu Asn Gln Lys Ser Glu Asn Pro Trp Arg Asp Leu Phe Leu Trp Ala	
	510 515 520 525	
	gtg ctg cag aac cgc cac gag atg gcc acc tac ttc tgg gcc atg ggc	1632
30	Val Leu Gln Asn Arg His Glu Met Ala Thr Tyr Phe Trp Ala Met Gly	
	530 535 540	
	cag gaa ggt gtg gca gcc gca ctg gcc gcc tgc aaa atc ctc aaa gag	1680
	Gln Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Ala Ala Cys Lys Ile Leu Lys Glu	
	545 550 555	
35		
	atg tcg cac ctg gag acg gag gcc gag gcg gcc cga gcc acg cgc gag	1728
	Met Ser His Leu Glu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Arg Ala Thr Arg Glu	
	560 565 570	
40	gcg aaa tac gag cgg ctg gcc ctt gac ctc ttc tcc gag tgc tac agc	1776
	Ala Lys Tyr Glu Arg Leu Ala Leu Asp Leu Phe Ser Glu Cys Tyr Ser	
	575 580 585	
	aac agt gag gcc cgc gcc ttc gcc ctg ctg gtg cgc cgg aac cgc tgc	1824
45	Asn Ser Glu Ala Arg Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Arg Asn Arg Cys	
	590 595 600 605	
	tgg agc aag acc acc tgc ctg cac ctg gcc acc gag gct gac gcc aag	1872
	Trp Ser Lys Thr Thr Cys Leu His Leu Ala Thr Glu Ala Asp Ala Lys	
	610 615 620	
50		
	gcc ttc ttt gcc cac gac ggc gtt cag gcc ttc ctg acc agg atc tgg	1920
	Ala Phe Phe Ala His Asp Gly Val Gln Ala Phe Leu Thr Arg Ile Trp	
	625 630 635	
55	tgg ggg gac atg gcc gca ggc acg ccc atc ctg cgg ctg cta gga gcc	1968
	Trp Gly Asp Met Ala Ala Gly Thr Pro Ile Leu Arg Leu Leu Gly Ala	
	640 645 650	
	ttc ctc tgc ccc gcc ctc gtc tat acc aac ctc atc acc ttc agt gag	2016
60	Phe Leu Cys Pro Ala Leu Val Tyr Thr Asn Leu Ile Thr Phe Ser Glu	
	655 660 665	

65

DE 199 53 167 A 1

gaa gct ccc ctg agg aca ggc ctg gag gac ctg cag gac ctg gac agc Glu Ala Pro Leu Arg Thr Gly Leu Glu Asp Leu Gln Asp Leu Asp Ser 670 675 680 685	2064	
ctg gac acg gag aag agc ccg ctg tat ggc ctg cag agc cgg gtg gag Leu Asp Thr Glu Lys Ser Pro Leu Tyr Gly Leu Gln Ser Arg Val Glu 690 695 700	2112	5
gag ctg gtg gag gcg ccg agg gct cag ggt gac cga ggc cca cgt gct Glu Leu Val Glu Ala Pro Arg Ala Gln Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ala 705 710 715	2160	10
gtc ttc ctg ctc aca cgc tgg cgg aaa ttc tgg ggc gct ccc gtg act Val Phe Leu Leu Thr Arg Trp Arg Lys Phe Trp Gly Ala Pro Val Thr 720 725 730	2208	15
gtg ttc ctg ggg aac gtg gtc atg tac ttc gcc ttc ctc ttc ctg ttc Val Phe Leu Gly Asn Val Val Met Tyr Phe Ala Phe Leu Phe Leu Phe 735 740 745	2256	
acc tac gtc ctg ctg gtg gac ttc agg ccg ccc ccc cag ggc ccc tca Thr Tyr Val Leu Leu Val Asp Phe Arg Pro Pro Gln Gly Pro Ser 750 755 760 765	2304	20
ggg ccc gag gtc acc ctc tac ttc tgg gtc ttt acg ctg gtg ctg gag Gly Pro Glu Val Thr Leu Tyr Phe Trp Val Phe Thr Leu Val Leu Glu 770 775 780	2352	25
gaa atc cgg cag ggc ttc ttc aca gac gag gac aca cac ctg gtg aag Glu Ile Arg Gln Gly Phe Phe Thr Asp Glu Asp Thr His Leu Val Lys 785 790 795	2400	30
aag ttc aca ctg tat gtg ggg gac aac tgg aac aag tgt gac atg gtg Lys Phe Thr Leu Tyr Val Gly Asp Asn Trp Asn Lys Cys Asp Met Val 800 805 810	2448	
gcc atc ttc ctg ttc atc gtg ggt gtc acc tgc agg atg ctg ccg tcc Ala Ile Phe Leu Phe Ile Val Gly Val Thr Cys Arg Met Leu Pro Ser 815 820 825	2496	35
gcg ttt gag gct ggc cgc acg gtc ctc gcc atg gac ttc atg gtg ttc Ala Phe Glu Ala Gly Arg Thr Val Leu Ala Met Asp Phe Met Val Phe 830 835 840 845	2544	40
acg ctg cgg ctg atc cat atc ttt gcc ata cac aag cag ctg ggc ccc Thr Leu Arg Leu Ile His Ile Phe Ala Ile His Lys Gln Leu Gly Pro 850 855 860	2592	45
aag atc atc gtg gta gag cgc atg atg aag gac gtc ttc ttc ttc ctc Lys Ile Ile Val Val Glu Arg Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu 865 870 875	2640	
ttc ttt ctg agc gtg tgg ctc gtg gcc tac ggt gtc acc acc cag gcg Phe Phe Leu Ser Val Trp Leu Val Ala Tyr Gly Val Thr Thr Gln Ala 880 885 890	2688	50
ctg ctg cac ccc cat gac ggc cgc ctg gag tgg atc ttc cgc cgg gtg Leu Leu His Pro His Asp Gly Arg Leu Glu Trp Ile Phe Arg Arg Val 895 900 905	2736	55
ctc tac cgg ccc tac ctg cag atc ttc ggc cag atc cca ctg gac gag Leu Tyr Arg Pro Tyr Leu Gln Ile Phe Gly Gln Ile Pro Leu Asp Glu 910 915 920 925	2784	60
att gat gaa gcc cgt gtg aac tgc tcc acc cac cca ctg ctg ctg gag Ile Asp Glu Ala Arg Val Asn Cys Ser Thr His Pro Leu Leu Leu Glu 930 935 940	2832	65

DE 199 53 167 A 1

	gac tca cca tcc tgc ccc agc ctc tat gcc aac tgg ctg gtc atc ctc Asp Ser Pro Ser Cys Pro Ser Leu Tyr Ala Asn Trp Leu Val Ile Leu 945 950 955	2880
5	ctg ctg gtc acc ttc ctg ttg gtc acc aat gtg ctg ctc atg aac ctg Leu Leu Val Thr Phe Leu Leu Val Thr Asn Val Leu Leu Met Asn Leu 960 965 970	2928
10	ctc atc gcc atg ttc agc tac acg ttc cag gtg gtg cag ggc aac gca Leu Ile Ala Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gln Val Val Gln Gly Asn Ala 975 980 985	2976
15	gac atg ttc tgg aag ttc cag cgc tac aac ctg att gtg gag tac cac Asp Met Phe Trp Lys Phe Gln Arg Tyr Asn Leu Ile Val Glu Tyr His 990 995 1000 1005	3024
20	gag cgc ccc gcc ctg gcc ccg ccc ttc atc ctg ctc agc cac ctg agc Glu Arg Pro Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile Leu Leu Ser His Leu Ser 1010 1015 1020	3072
	ctg acg ctc cgc cgg gtc ttc aag aag gag gct gag cac aag cgg gag Leu Thr Leu Arg Arg Val Phe Lys Lys Glu Ala Glu His Lys Arg Glu 1025 1030 1035	3120
25	cac ctg gag aga gac ctg cca gac ccc ctg gac cag aag gtc gtc acc His Leu Glu Arg Asp Leu Pro Asp Pro Leu Asp Gln Lys Val Val Thr 1040 1045 1050	3168
30	tgg gag aca gtc cag aag gag aac ttc ctg agc aag atg gag aag cgg Trp Glu Thr Val Gln Lys Glu Asn Phe Leu Ser Lys Met Glu Lys Arg 1055 1060 1065	3216
35	agg agg gac agc gag ggg gag gtg ctg cgg aaa acc gcc cac aga gtg Arg Arg Asp Ser Glu Gly Glu Val Leu Arg Lys Thr Ala His Arg Val 1070 1075 1080 1085	3264
	gac ttc att gcc aag tac ctc ggg ggg ctg aga gag caa gaa aag cgc Asp Phe Ile Ala Lys Tyr Leu Gly Gly Leu Arg Glu Gln Glu Lys Arg 1090 1095 1100	3312
40	atc aag tgt ctg gag tca cag atc aac tac tgc tgc gtg ctc gtg tcc Ile Lys Cys Leu Glu Ser Gln Ile Asn Tyr Cys Ser Val Leu Val Ser 1105 1110 1115	3360
45	tcc gtg gct gac gtg ctg gcc cag ggt gcc ggc ccc cgg agc tct cag Ser Val Ala Asp Val Leu Ala Gln Gly Gly Gly Pro Arg Ser Ser Gln 1120 1125 1130	3408
50	cac tgt gcc gag gga agc cag ctg gtg gct gct gac cac aga ggt ggt His Cys Gly Glu Gly Ser Gln Leu Val Ala Ala Asp His Arg Gly Gly 1135 1140 1145	3456
	tta gat gcc tgg gaa caa ccc ggg gct gcc cag cct ccc teg gac aca Leu Asp Gly Trp Glu Gln Pro Gly Ala Gly Gln Pro Pro Ser Asp Thr 1150 1155 1160 1165	3504
55	tgagctgctt ggccctgccac gtgtggggcc acctctcttc agttggccac cctgcacgtt	3564
	gtgcactgac ctttgccgac ctccagcggg accccccagg gggcaccagc cccccagcag	3624
60	acaatggccc tcttggtgcc tcaccacaga ccctcaccga aaggaaaccgc tcttggtccc	3684
	tcttggtccc cccggaggca cagcagtgtc atggggctgt ctcccctgac aggcacaact	3744
	ccccgggcag aaaacgtgcc ccaccgcac cctacctgga aactgaccag cctgcactgt	3804

65

DE 199 53 167 A 1

```

ggaaaagctg gccctgtggc gtgacggggg agcacccecca tccagactgc gaagctgctc 3864
tgggtctgca cccaccctg cctgacttg tgttgctga caagagact 3913

<210> 2
<211> 1165
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Asp Val Gln Gly Pro Arg Pro Gly Ser Pro Gly Asp Ala Glu 15
 1      5      10
Asp Arg Arg Glu Leu Gly Leu His Arg Gly Glu Val Asn Phe Gly Gly 20
 20     25     30
Ser Gly Lys Lys Arg Gly Lys Phe Val Arg Val Pro Ser Gly Val Ala 25
 35     40     45
Pro Ser Val Leu Phe Asp Leu Leu Leu Ala Glu Trp His Leu Pro Ala 30
 50     55     60
Pro Asn Leu Val Val Ser Leu Val Gly Glu Glu Gln Pro Phe Ala Met 35
 65     70     75
Lys Ser Trp Leu Arg Asp Val Leu Arg Lys Gly Leu Val Lys Ala Ala 40
 85     90     95
Gln Ser Thr Gly Ala Trp Ile Leu Thr Ser Ala Leu Arg Val Gly Leu 45
100    105    110
Ala Arg His Val Gly Gln Ala Val Arg Asp His Ser Leu Ala Ser Thr 50
115    120    125
Ser Thr Lys Val Arg Val Val Ala Val Gly Met Ala Ser Leu Gly Arg 55
130    135    140
Val Leu His Arg Arg Ile Leu Glu Glu Ala Gln Glu Asp Phe Pro Val 60
145    150    155
His Tyr Pro Glu Asp Asp Gly Gly Ser Gln Gly Pro Leu Cys Ser Leu 65
165    170    175
Asp Ser Asn Leu Ser His Phe Ile Leu Val Glu Pro Gly Pro Pro Gly 70
180    185    190
Lys Gly Asp Gly Leu Thr Glu Leu Arg Leu Arg Leu Glu Lys His Ile 75
195    200    205
Ser Glu Gln Arg Ala Gly Tyr Gly Gly Thr Gly Ser Ile Glu Ile Pro 80
210    215    220
Val Leu Cys Leu Leu Val Asn Gly Asp Pro Asn Thr Leu Glu Arg Ile 85
225    230    235
Ser Arg Ala Val Glu Gln Ala Ala Pro Trp Leu Ile Leu Val Gly Ser 90
245    250    255
Gly Gly Ile Ala Asp Val Leu Ala Ala Leu Val Asn Gln Pro His Leu 95
260    265    270
Leu Val Pro Lys Val Ala Glu Lys Gln Phe Lys Glu Lys Phe Pro Ser 100
275    280    285

```

DE 199 53 167 A 1

Lys His Phe Ser Trp Glu Asp Ile Val Arg Trp Thr Lys Leu Leu Gln
 290 295 300
 5 Asn Ile Thr Ser His Gln His Leu Leu Thr Val Tyr Asp Phe Glu Gln
 305 310 315 320
 Glu Gly Ser Glu Glu Leu Asp Thr Val Ile Leu Lys Ala Leu Val Lys
 325 330 335
 10 Ala Cys Lys Ser His Ser Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Leu Asp Glu Leu
 340 345 350
 Lys Leu Ala Val Ala Trp Asp Arg Val Asp Ile Ala Lys Ser Glu Ile
 355 360 365
 15 Phe Asn Gly Asp Val Glu Trp Lys Ser Cys Asp Leu Glu Glu Val Met
 370 375 380
 Val Asp Ala Leu Val Ser Asn Lys Pro Glu Phe Val Arg Leu Phe Val
 385 390 395 400
 20 Asp Asn Gly Ala Asp Val Ala Asp Phe Leu Thr Tyr Gly Arg Leu Gln
 405 410 415
 25 Glu Leu Tyr Arg Ser Val Ser Arg Lys Ser Leu Leu Phe Asp Leu Leu
 420 425 430
 Gln Arg Lys Gln Glu Glu Ala Arg Leu Thr Leu Ala Gly Leu Gly Thr
 435 440 445
 30 Gln Gln Ala Arg Glu Pro Pro Ala Gly Pro Pro Ala Phe Ser Leu His
 450 455 460
 Glu Val Ser Arg Val Leu Lys Asp Phe Leu Gln Asp Ala Cys Arg Gly
 465 470 475 480
 35 Phe Tyr Gln Asp Gly Arg Pro Gly Asp Arg Arg Arg Ala Glu Lys Gly
 485 490 495
 Pro Ala Lys Arg Pro Thr Gly Gln Lys Trp Leu Leu Asp Leu Asn Gln
 500 505 510
 40 Lys Ser Glu Asn Pro Trp Arg Asp Leu Phe Leu Trp Ala Val Leu Gln
 515 520 525
 Asn Arg His Glu Met Ala Thr Tyr Phe Trp Ala Met Gly Gln Glu Gly
 530 535 540
 45 Val Ala Ala Ala Leu Ala Ala Cys Lys Ile Leu Lys Glu Met Ser His
 545 550 555 560
 50 Leu Glu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Arg Ala Thr Arg Glu Ala Lys Tyr
 565 570 575
 Glu Arg Leu Ala Leu Asp Leu Phe Ser Glu Cys Tyr Ser Asn Ser Glu
 580 585 590
 55 Ala Arg Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Arg Asn Arg Cys Trp Ser Lys
 595 600 605
 Thr Thr Cys Leu His Leu Ala Thr Glu Ala Asp Ala Lys Ala Phe Phe
 610 615 620
 60 Ala His Asp Gly Val Gln Ala Phe Leu Thr Arg Ile Trp Trp Gly Asp
 625 630 635 640
 65

DE 199 53 167 A 1

Met Ala Ala Gly Thr Pro Ile Leu Arg Leu Leu Gly Ala Phe Leu Cys 645 650 655	
Pro Ala Leu Val Tyr Thr Asn Leu Ile Thr Phe Ser Glu Glu Ala Pro 660 665 670	5
Leu Arg Thr Gly Leu Glu Asp Leu Gln Asp Leu Asp Ser Leu Asp Thr 675 680 685	
Glu Lys Ser Pro Leu Tyr Gly Leu Gln Ser Arg Val Glu Glu Leu Val 690 695 700	10
Glu Ala Pro Arg Ala Gln Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ala Val Phe Leu 705 710 715 720	
Leu Thr Arg Trp Arg Lys Phe Trp Gly Ala Pro Val Thr Val Phe Leu 725 730 735	15
Gly Asn Val Val Met Tyr Phe Ala Phe Leu Phe Leu Phe Thr Tyr Val 740 745 750	20
Leu Leu Val Asp Phe Arg Pro Pro Pro Gln Gly Pro Ser Gly Pro Glu 755 760 765	
Val Thr Leu Tyr Phe Trp Val Phe Thr Leu Val Leu Glu Glu Ile Arg 770 775 780	25
Gln Gly Phe Phe Thr Asp Glu Asp Thr His Leu Val Lys Lys Phe Thr 785 790 795 800	
Leu Tyr Val Gly Asp Asn Trp Asn Lys Cys Asp Met Val Ala Ile Phe 805 810 815	30
Leu Phe Ile Val Gly Val Thr Cys Arg Met Leu Pro Ser Ala Phe Glu 820 825 830	
Ala Gly Arg Thr Val Leu Ala Met Asp Phe Met Val Phe Thr Leu Arg 835 840 845	35
Leu Ile His Ile Phe Ala Ile His Lys Gln Leu Gly Pro Lys Ile Ile 850 855 860	40
Val Val Glu Arg Met Met Lys Asp Val Phe Phe Phe Leu Phe Phe Leu 865 870 875 880	
Ser Val Trp Leu Val Ala Tyr Gly Val Thr Thr Gln Ala Leu Leu His 885 890 895	45
Pro His Asp Gly Arg Leu Glu Trp Ile Phe Arg Arg Val Leu Tyr Arg 900 905 910	
Pro Tyr Leu Gln Ile Phe Gly Gln Ile Pro Leu Asp Glu Ile Asp Glu 915 920 925	50
Ala Arg Val Asn Cys Ser Thr His Pro Leu Leu Leu Glu Asp Ser Pro 930 935 940	
Ser Cys Pro Ser Leu Tyr Ala Asn Trp Leu Val Ile Leu Leu Leu Val 945 950 955 960	55
Thr Phe Leu Leu Val Thr Asn Val Leu Leu Met Asn Leu Leu Ile Ala 965 970 975	60
Met Phe Ser Tyr Thr Phe Gln Val Val Gln Gly Asn Ala Asp Met Phe 980 985 990	65

DE 199 53 167 A 1

Trp Lys Phe Gln Arg Tyr Asn Leu Ile Val Glu Tyr His Glu Arg Pro
 995 1000 1005
 5 Ala Leu Ala Pro Pro Phe Ile Leu Leu Ser His Leu Ser Leu Thr Leu
 1010 1015 1020
 Arg Arg Val Phe Lys Lys Glu Ala Glu His Lys Arg Glu His Leu Glu
 1025 1030 1035 1040
 10 Arg Asp Leu Pro Asp Pro Leu Asp Gln Lys Val Val Thr Trp Glu Thr
 1045 1050 1055
 Val Gln Lys Glu Asn Phe Leu Ser Lys Met Glu Lys Arg Arg Arg Asp
 1060 1065 1070
 15 Ser Glu Gly Glu Val Leu Arg Lys Thr Ala His Arg Val Asp Phe Ile
 1075 1080 1085
 Ala Lys Tyr Leu Gly Gly Leu Arg Glu Gln Glu Lys Arg Ile Lys Cys
 1090 1095 1100
 20 Leu Glu Ser Gln Ile Asn Tyr Cys Ser Val Leu Val Ser Ser Val Ala
 1105 1110 1115 1120
 25 Asp Val Leu Ala Gln Gly Gly Gly Pro Arg Ser Ser Gln His Cys Gly
 1125 1130 1135
 Glu Gly Ser Gln Leu Val Ala Ala Asp His Arg Gly Gly Leu Asp Gly
 1140 1145 1150
 30 Trp Glu Gln Pro Gly Ala Gly Gln Pro Pro Ser Asp Thr
 1155 1160 1165

 35 <210> 3
 <211> 2628
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (10) ... (2625)
 <400> 3 -

 45 gagggccacc atg cag gat gtc caa ggc ccc cgt ccc gga agc ccc ggg 48
 Met Gln Asp Val Gln Gly Pro Arg Pro Gly Ser Pro Gly
 1 5 10

 gat gct gaa gac cgg cgg gag ctg ggc ttg cac agg ggc gag gtc aac 96
 50 Asp Ala Glu Asp Arg Arg Glu Leu Gly Leu His Arg Gly Glu Val Asn
 15 20 25

 ttt gga ggg tct ggg aag aag cga ggc aag ttt gta cgg gtg ccg agc 144
 Phe Gly Gly Ser Gly Lys Lys Arg Gly Lys Phe Val Arg Val Pro Ser
 30 35 40 45
 55 gga gtg gcc ccg tct gtg ctc ttt gac ctg ctg ctt gct gag tgg cac 192
 Gly Val Ala Pro Ser Val Leu Phe Asp Leu Leu Leu Ala Glu Trp His
 50 55 60

 60 ctg ccg gcc ccc aac ctg gtg gtg tcc ctg gtg ggt gag gag cag cct 240
 Leu Pro Ala Pro Asn Leu Val Val Ser Leu Val Gly Glu Glu Gln Pro
 65 70 75

 65

DE 199 53 167 A 1

ttc gcc atg aag tcc tgg ctg cgg gat gtg ctg cgc aag ggg ctg gtg Phe Ala Met Lys Ser Trp Leu Arg Asp Val Leu Arg Lys Gly Leu Val 80 85 90	288	
aag gcg gct cag agc aca gga gcc tgg atc ctg acc agt gcc ctc cgc Lys Ala Ala Gln Ser Thr Gly Ala Trp Ile Leu Thr Ser Ala Leu Arg 95 100 105	336	5
gtg ggc ctg gcc agg cat gtc ggg cag gcc gtg cgc gac cac tcg ctg Val Gly Leu Ala Arg His Val Gly Gln Ala Val Arg Asp His Ser Leu 110 115 120 125	384	10
gcc agc acg tcc acc aag gtc cgt gtg gtt gct gtc gcc atg gcc tcg Ala Ser Thr Ser Thr Lys Val Arg Val Val Ala Val Gly Met Ala Ser 130 135 140	432	15
ctg ggc cgc gtc ctg cac cgc cgc att ctg gag gag gcc cag gag gat Leu Gly Arg Val Leu His Arg Arg Ile Leu Glu Glu Ala Gln Glu Asp 145 150 155	480	20
ttt cct gtc cac tac cct gag gat gac ggc ggc agc cag ggc ccc ctc Phe Pro Val His Tyr Pro Glu Asp Asp Gly Gly Ser Gln Gly Pro Leu 160 165 170	528	25
tgt tca ctg gac agc aac ctc tcc cac ttc atc ctg gtg gag cca ggc Cys Ser Leu Asp Ser Asn Leu Ser His Phe Ile Leu Val Glu Pro Gly 175 180 185	576	30
ccc ccg ggg aag ggc gat ggg ctg acg gag ctg ccg ctg agg ctg gag Pro Pro Gly Lys Gly Asp Gly Leu Thr Glu Leu Arg Leu Arg Leu Glu 190 195 200 205	624	35
aag cac atc tcg gag cag agg gcg ggc tac ggg ggc act ggc agc atc Lys His Ile Ser Glu Gln Arg Ala Gly Tyr Gly Gly Thr Gly Ser Ile 210 215 220	672	40
gag atc cct gtc ctc tgc ttg ctg gtc aat ggt gat ccc aac acc ttg Glu Ile Pro Val Leu Cys Leu Leu Val Asn Gly Asp Pro Asn Thr Leu 225 230 235	720	45
gag agg atc tcc agg gcc gtg gag cag gct gcc ccg tgg ctg atc ctg Glu Arg Ile Ser Arg Ala Val Glu Gln Ala Ala Pro Trp Leu Ile Leu 240 245 250	768	50
gta ggc tcg ggg ggc atc gcc gat gtg ctt gct gcc cta gtg aac cag Val Gly Ser Gly Gly Ile Ala Asp Val Leu Ala Leu Val Asn Gln 255 260 265	816	55
ccc cac ctc ctg gtg ccc aag gtg gcc gag aag cag ttt aag gag aag Pro His Leu Leu Val Pro Lys Val Ala Glu Lys Gln Phe Lys Glu Lys 270 275 280 285	864	60
ttc ccc agc aag cat ttc tct tgg gag gac atc gtg cgc tgg acc aag Phe Pro Ser Lys His Phe Ser Trp Glu Asp Ile Val Arg Trp Thr Lys 290 295 300	912	65
ctg ctg cag aac atc acc tca cac cag cac ctg ctc acc gtg tat gac Leu Leu Gln Asn Ile Thr Ser His Gln His Leu Leu Thr Val Tyr Asp 305 310 315	960	
ttc gag cag gag ggc tcc gag gag ctg gac acg gtc atc ctg aag gcg Phe Glu Gln Glu Gly Ser Glu Glu Leu Asp Thr Val Ile Leu Lys Ala 320 325 330	1008	
ctg gtg aaa gcc tgc aag agc cac agc cag gag cct cag gac tat ctg Leu Val Lys Ala Cys Lys Ser His Ser Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Leu 335 340 345	1056	

DE 199 53 167 A 1

	gat gag ctc aag ctg gcc gtg gcc tgg gac cgc gtg gac atc gcc aag Asp Glu Leu Lys Leu Ala Val Ala Trp Asp Arg Val Asp Ile Ala Lys 350 355 360 365	1104
5	agt gag atc ttc aat ggg gac gtg gag tgg aag tcc tgt gac ctg gag Ser Glu Ile Phe Asn Gly Asp Val Glu Trp Lys Ser Cys Asp Leu Glu 370 375 380	1152
10	gag gtg atg gtg gac gcc ctg gtc agc aac aag ccc gag ttt gtg cgc Glu Val Met Val Asp Ala Leu Val Ser Asn Lys Pro Glu Phe Val Arg 385 390 395	1200
15	ctc ttt gtg gac aac ggc gca gac gtg gcc gac ttc ctg acg tat ggg Leu Phe Val Asp Asn Gly Ala Asp Val Ala Asp Phe Leu Thr Tyr Gly 400 405 410	1248
20	cgg ctg cag gag ctc tac cgc tcc gtg tca cgc aag agc ctg ctc ttc Arg Leu Gln Glu Leu Tyr Arg Ser Val Ser Arg Lys Ser Leu Leu Phe 415 420 425	1296
25	gac ctg ctg cag cgg aag cag gag gag gcc cgg ctg acg ctg gcc ggc Asp Leu Leu Gln Arg Lys Gln Glu Glu Ala Arg Leu Thr Leu Ala Gly 430 435 440 445	1344
30	ctg ggc acc cag cag gcc cgg gag cca ccc gcg ggg cca ccg gcc ttc Leu Gly Thr Gln Ala Arg Glu Pro Pro Ala Gly Pro Pro Ala Phe 450 455 460	1392
35	tcc ctg cac gag gtc tcc cgc gta ctc aag gac ttc ctg cag gac gcc Ser Leu His Glu Val Ser Arg Val Leu Lys Asp Phe Leu Gln Asp Ala 465 470 475	1440
40	tgc cga ggc ttc tac cag gac ggc cgg cca ggg gac cgc agg agg gcg Cys Arg Gly Phe Tyr Gln Asp Gly Arg Pro Gly Asp Arg Arg Ala 480 485 490	1488
45	gag aag ggc ccg gcc aag cgg ccc acg ggc cag aag tgg ctg ctg gac Glu Lys Gly Pro Ala Lys Arg Pro Thr Gly Gln Lys Trp Leu Leu Asp 495 500 505	1536
50	ctg aac cag aag agc gag aac ccc tgg cgg gac ctg ttc ctg tgg gcc Leu Asn Gln Lys Ser Glu Asn Pro Trp Arg Asp Leu Phe Leu Trp Ala 510 515 520 525	1584
55	gtg ctg cag aac cgc cac gag atg gcc acc tac ttc tgg gcc atg ggc Val Leu Gln Asn Arg His Glu Met Ala Thr Tyr Phe Trp Ala Met Gly 530 535 540	1632
60	cag gaa ggt gtg gca gcc gca ctg gcc gcc tgc aaa atc ctc aaa gag Gln Glu Gly Val Ala Ala Ala Leu Ala Ala Cys Lys Ile Leu Lys Glu 545 550 555	1680
65	atg tcg cac ctg gag acg gag gcc gag gcg gcc cga gcc acg cgc gag Met Ser His Leu Glu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Arg Ala Thr Arg Glu 560 565 570	1728
70	gcg aaa tac gag cgg ctg gcc ctt gac ctc ttc tcc gag tgc tac agc Ala Lys Tyr Glu Arg Leu Ala Leu Asp Leu Phe Ser Glu Cys Tyr Ser 575 580 585	1776
75	aac agt gag gcc cgc gcc ttc gcc ctg ctg gtg cgc cgg aac cgc tgc Asn Ser Glu Ala Arg Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Arg Asn Arg Cys 590 595 600 605	1824

DE 199 53 167 A 1

tgg agc aag acc acc tgc ctg cac ctg gcc acc gag gct gac gcc aag Trp Ser Lys Thr 610 Leu Cys Leu His Leu Ala Thr Glu Ala Asp Ala Lys 620	1872	
gcc ttc ttt gcc cac gac ggc gtt cag gcc ttc ctg acc agg atc tgg Ala Phe Phe 625 His Asp Gly Val Gln Ala Phe Leu Thr Arg Ile Trp 635	1920	5
tgg ggg gac atg gcc gca ggc acg ccc atc ctg cgg ctg cta gga gcc Trp Gly 640 Asp Met Ala Ala Gly Thr Pro Ile Leu Arg Leu Leu Gly Ala 650	1968	10
ttc ctg tgc ccc gcc ctg gtc tat acc aac ctg atc acc ttc agt gag Phe Leu Cys Pro Ala Leu 660 Tyr Thr Asn Leu Ile Thr Phe Ser Glu 665	2016	15
gaa gct ccc ctg agg aca ggc ctg gag gac ctg cag gac ctg gac agc Glu Ala Pro Leu Arg 675 Thr Gly Leu Glu Asp 680 Gln Asp Leu Asp Ser 685	2064	20
ctg gac acg gag aag agc ccg ctg tat ggc ctg cag agc cgg gtg gag Leu Asp Thr Glu Lys Ser Pro Leu Tyr 695 Gly Leu Gln Ser Arg Val Glu 700	2112	25
gag ctg gtg gag ggc ccg agg gct cag ggt gac cga ggc cca cgt gct Glu Leu Val Glu Ala Pro Arg Ala Gln Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ala 705 710 715	2160	30
gtc ttc ctg ctg aca cgc tgg cgg aaa ttc tgg ggc gct ccc gtg act Val Phe Leu Leu Thr Arg Trp Arg Lys Phe Trp Gly Ala Pro Val Thr 720 725 730	2208	35
gtg ttc ctg ggg aac gtg gtc atg tac ttc gcc ttc ctg ttc ctg ttc Val Phe Leu Gly Asn Val Val Met Tyr Phe Ala Phe Leu Phe Leu Phe 735 740 745	2256	40
acc tac gtc ctg ctg gtg gac ttc agg ccg ccc ccc cag ggc ccc tca Thr Tyr Val Leu Leu 755 Val Asp Phe Arg Pro Pro Gln Gly Pro Ser 760 765	2304	45
ggg ccc gag gtc acc ctg tac ttc tgg gtc ttt acg ctg gtg ctg gag Gly Pro Glu Val Thr Leu Tyr Phe Trp Val Phe Thr Leu Val Leu Glu 770 775 780	2352	50
gaa atc cgg cag ggc ttc ttc aca gac gag gac aca cac ctg gtg aag Glu Ile Arg Gln Gly Phe Phe Thr Asp Glu Asp Thr His Leu Val Lys 785 790 795	2400	55
aag ttc aca ctg tat gtg ggg gac aac tgg aac aag tgt gac atg gtg Lys Phe Thr Leu Tyr Val Gly Asp Asn Trp Asn Lys Cys Asp Met Val 800 805 810	2448	60
gcc atc ttc ctg ttc atc gtg ggt gtc acc tgc agg atg ctg ccg tgc Ala Ile Phe Leu Phe Ile Val Gly Val Thr Cys Arg Met Leu Pro Ser 815 820 825	2496	65
gcg ttt gag gct ggc cgc acg gtc ctg gcc atg gac ttc atg gtg ttc Ala Phe Glu Ala Gly Arg Thr Val Leu Ala Met Asp Phe Met Val Phe 830 835 840 845	2544	
acg ctg cgg ctg atc cat atc ttt gcc ata cac aag cag ctg ggc ccc Thr Leu Arg Leu Ile His Ile Phe Ala Ile His Lys Gln Leu Gly Pro 850 855 860	2592	

DE 199 53 167 A 1

aag atc atc gtg gta gag cgc atg aag ccc gtg tga
Lys Ile Ile Val Val Glu Arg Met Lys Pro Val *
865 870

2628

5

<210> 4

<211> 872

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 4

15

Met Gln Asp Val Gln Gly Pro Arg Pro Gly Ser Pro Gly Asp Ala Glu
1 5 10 15

Asp Arg Arg Glu Leu Gly Leu His Arg Gly Glu Val Asn Phe Gly Gly
20 25 30

20

Ser Gly Lys Lys Arg Gly Lys Phe Val Arg Val Pro Ser Gly Val Ala
35 40 45

25

Pro Ser Val Leu Phe Asp Leu Leu Leu Ala Glu Trp His Leu Pro Ala
50 55 60

Pro Asn Leu Val Val Ser Leu Val Gly Glu Glu Gln Pro Phe Ala Met
65 70 75 80

30

Lys Ser Trp Leu Arg Asp Val Leu Arg Lys Gly Leu Val Lys Ala Ala
85 90 95

Gln Ser Thr Gly Ala Trp Ile Leu Thr Ser Ala Leu Arg Val Gly Leu
100 105 110

35

Ala Arg His Val Gly Gln Ala Val Arg Asp His Ser Leu Ala Ser Thr
115 120 125

Ser Thr Lys Val Arg Val Val Ala Val Gly Met Ala Ser Leu Gly Arg
130 135 140

40

Val Leu His Arg Arg Ile Leu Glu Glu Ala Gln Glu Asp Phe Pro Val
145 150 155 160

45

His Tyr Pro Glu Asp Asp Gly Gly Ser Gln Gly Pro Leu Cys Ser Leu
165 170 175

Asp Ser Asn Leu Ser His Phe Ile Leu Val Glu Pro Gly Pro Gly
180 185 190

50

Lys Gly Asp Gly Leu Thr Glu Leu Arg Leu Arg Leu Glu Lys His Ile
195 200 205

Ser Glu Gln Arg Ala Gly Tyr Gly Gly Thr Gly Ser Ile Glu Ile Pro
210 215 220

55

Val Leu Cys Leu Leu Val Asn Gly Asp Pro Asn Thr Leu Glu Arg Ile
225 230 235 240

Ser Arg Ala Val Glu Gln Ala Ala Pro Trp Leu Ile Leu Val Gly Ser
245 250 255

60

Gly Gly Ile Ala Asp Val Leu Ala Ala Leu Val Asn Gln Pro His Leu
260 265 270

65

DE 199 53 167 A 1

Leu Val Pro Lys Val Ala Glu Lys Gln Phe Lys Glu Lys Phe Pro Ser	275	280	285	
Lys His Phe Ser Trp Glu Asp Ile Val Arg Trp Thr Lys Leu Leu Gln	290	295	300	5
Asn Ile Thr Ser His Gln His Leu Leu Thr Val Tyr Asp Phe Glu Gln	305	310	315	
Glu Gly Ser Glu Glu Leu Asp Thr Val Ile Leu Lys Ala Leu Val Lys	325	330	335	10
Ala Cys Lys Ser His Ser Gln Glu Pro Gln Asp Tyr Leu Asp Glu Leu	340	345	350	
Lys Leu Ala Val Ala Trp Asp Arg Val Asp Ile Ala Lys Ser Glu Ile	355	360	365	15
Phe Asn Gly Asp Val Glu Trp Lys Ser Cys Asp Leu Glu Glu Val Met	370	375	380	20
Val Asp Ala Leu Val Ser Asn Lys Pro Glu Phe Val Arg Leu Phe Val	385	390	395	
Asp Asn Gly Ala Asp Val Ala Asp Phe Leu Thr Tyr Gly Arg Leu Gln	405	410	415	25
Glu Leu Tyr Arg Ser Val Ser Arg Lys Ser Leu Leu Phe Asp Leu Leu	420	425	430	
Gln Arg Lys Gln Glu Glu Ala Arg Leu Thr Leu Ala Gly Leu Gly Thr	435	440	445	30
Gln Gln Ala Arg Glu Pro Pro Ala Gly Pro Pro Ala Phe Ser Leu His	450	455	460	
Glu Val Ser Arg Val Leu Lys Asp Phe Leu Gln Asp Ala Cys Arg Gly	465	470	475	35
Phe Tyr Gln Asp Gly Arg Pro Gly Asp Arg Arg Arg Ala Glu Lys Gly	485	490	495	40
Pro Ala Lys Arg Pro Thr Gly Gln Lys Trp Leu Leu Asp Leu Asn Gln	500	505	510	
Lys Ser Glu Asn Pro Trp Arg Asp Leu Phe Leu Trp Ala Val Leu Gln	515	520	525	45
Asn Arg His Glu Met Ala Thr Tyr Phe Trp Ala Met Gly Gln Glu Gly	530	535	540	
Val Ala Ala Ala Leu Ala Ala Cys Lys Ile Leu Lys Glu Met Ser His	545	550	555	50
Leu Glu Thr Glu Ala Glu Ala Ala Arg Ala Thr Arg Glu Ala Lys Tyr	565	570	575	
Glu Arg Leu Ala Leu Asp Leu Phe Ser Glu Cys Tyr Ser Asn Ser Glu	580	585	590	55
Ala Arg Ala Phe Ala Leu Leu Val Arg Arg Asn Arg Cys Trp Ser Lys	595	600	605	
Thr Thr Cys Leu His Leu Ala Thr Glu Ala Asp Ala Lys Ala Phe Phe	610	615	620	60
				65

DE 199 53 167 A 1

Ala His Asp Gly Val Gln Ala Phe Leu Thr Arg Ile Trp Trp Gly Asp
 625 630 635 640
 5 Met Ala Ala Gly Thr Pro Ile Leu Arg Leu Leu Gly Ala Phe Leu Cys
 645 650 655
 Pro Ala Leu Val Tyr Thr Asn Leu Ile Thr Phe Ser Glu Glu Ala Pro
 660 665 670
 10 Leu Arg Thr Gly Leu Glu Asp Leu Gln Asp Leu Asp Ser Leu Asp Thr
 675 680 685
 Glu Lys Ser Pro Leu Tyr Gly Leu Gln Ser Arg Val Glu Glu Leu Val
 690 695 700
 15 Glu Ala Pro Arg Ala Gln Gly Asp Arg Gly Pro Arg Ala Val Phe Leu
 705 710 715 720
 Leu Thr Arg Trp Arg Lys Phe Trp Gly Ala Pro Val Thr Val Phe Leu
 725 730 735
 20 Gly Asn Val Val Met Tyr Phe Ala Phe Leu Phe Leu Phe Thr Tyr Val
 740 745 750
 Leu Leu Val Asp Phe Arg Pro Pro Gln Gly Pro Ser Gly Pro Glu
 755 760 765
 25 Val Thr Leu Tyr Phe Trp Val Phe Thr Leu Val Leu Glu Glu Ile Arg
 770 775 780
 30 Gln Gly Phe Phe Thr Asp Glu Asp Thr His Leu Val Lys Lys Phe Thr
 785 790 795 800
 Leu Tyr Val Gly Asp Asn Trp Asn Lys Cys Asp Met Val Ala Ile Phe
 805 810 815
 35 Leu Phe Ile Val Gly Val Thr Cys Arg Met Leu Pro Ser Ala Phe Glu
 820 825 830
 Ala Gly Arg Thr Val Leu Ala Met Asp Phe Met Val Phe Thr Leu Arg
 835 840 845
 40 Leu Ile His Ile Phe Ala Ile His Lys Gln Leu Gly Pro Lys Ile Ile
 850 855 860
 Val Val Glu Arg Met Lys Pro Val
 865 870
 45

<210> 5
 <211> 19
 50 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 55 <400> 5
 gtgctgtctt cctgctcac

60 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

65

<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer		
<400> 6		5
tgacacccac gatgaacagg	20	
<210> 7		10
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		15
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer		
<400> 7		
ggacttcacg gtgttcacgc	20	20
<210> 8		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		25
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer		
<400> 8		30
cgtgggtactc cacaatcagg	20	
<210> 9		35
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		40
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer		
<400> 9		
ccatgcagga tgtccaaggc	20	45
<210> 10		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		50
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer		
<400> 10		55
tcaggcaaca caagtcagg	19	

Patentansprüche 60

1. DNA-Sequenz, die für ein Protein (MTR1) mit einer der in Fig. 4 gezeigten Aminosäuresequenzen codiert, wobei das Protein (MTR1) mindestens eine biologische Aktivität eines Proteins der TRP-Familie aufweist und/oder an der Ätiologie von BWS und/oder mit 11p15.5-Veränderungen assoziierten Tumoren in Zusammenhang steht.
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, die eine der in Fig. 4 gezeigten DNA-Sequenzen umfaßt.
3. DNA-Sequenz, die ein Protein mit den biologischen Eigenschaften von MTR1 codiert,
 - (a) die sich von der DNA-Sequenz von Anspruch 2 in der Codonsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheidet;

- (b) die mit der DNA-Sequenz von Anspruch 2 oder 3(a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert;
 (c) die zu der DNA-Sequenz nach Anspruch 2 oder 3(a) eine Homologie von mindestens 75% aufweist; oder
 (d) die ein Fragment, eine allelische Variante oder eine andere Variante der DNA-Sequenz von Anspruch 2 oder 3(a) bis 3(c) ist.
- 5 4. DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Protein an der Ca^{2+} -Regulation innerhalb der Zelle beteiligt ist.
5. Ribozym, dadurch gekennzeichnet, daß es zu der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 komplementär ist und an die von dieser DNA-Sequenz transkribierte RNA spezifisch binden und diese spalten kann, wodurch die Synthese des von dieser DNA-Sequenz codierten Proteins verringert oder gehemmt wird.
- 10 6. Antisense-RNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie zu der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 komplementär ist und an die von dieser DNA-Sequenz transkribierte RNA spezifisch binden kann, wodurch die Synthese des von dieser DNA-Sequenz codierten Proteins verringert oder gehemmt wird.
7. Expressionsvektor, die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder die das Ribozym nach Anspruch 5 oder die Antisense-RNA nach Anspruch 6 codierende DNA enthaltend.
- 15 8. Wirtszelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 7 transformiert ist.
9. MTR1-Protein, Fragment oder Protein mit dessen biologischer Aktivität, das von der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codiert wird.
10. MTR1-Protein nach Anspruch 9, das die in Fig. 4 gezeigte Aminosäuresequenz umfaßt.
11. Verfahren zur Herstellung eines MTR1-Proteins oder eines Proteins mit dessen biologischer Aktivität, das die Züchtung der Wirtszelle nach Anspruch 8 unter geeigneten Bedingungen und die Gewinnung des Proteins aus der Zelle oder dem Zuchtmedium umfaßt.
- 20 12. Antikörper oder Fragment davon, der (das) an das MTR1-Protein oder ein Protein mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 9 oder 10 spezifisch bindet.
13. Arzneimittel, das eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das Ribozym nach Anspruch 5, die Antisense-RNA nach Anspruch 6, den Expressionsvektor nach Anspruch 7, das MTR1-Protein oder Protein mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 9 oder 10 oder den Antikörper nach Anspruch 12 oder das Fragment davon enthält.
- 25 14. Verwendung der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, des Ribozyms nach Anspruch 5, der Antisense-RNA nach Anspruch 6, des Expressionsvektors nach Anspruch 7, des MTR1-Proteins oder des Proteins mit dessen biologischer Aktivität nach Anspruch 9 oder 10 oder des Antikörpers nach Anspruch 12 oder des Fragments davon zur Prävention oder Behandlung von Erkrankungen, die mit einer veränderten Expression der MTR1 codierenden DNA-Sequenz, einer veränderten Aktivität des MTR1-Proteins oder einer fehlerhaften Regulation des Ca^{2+} -Eintritts in die Zellen assoziiert sind.
15. Diagnoseverfahren zum Nachweis einer eventuell gestörten MTR1-Expression, bei dem man eine Probe mit der DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder dem Antikörper nach Anspruch 12 oder des Fragments davon in Berührung bringt und direkt oder indirekt bestimmt, ob sich die Konzentration, Länge und/oder Sequenz des MTR1-Proteins oder der dieses Protein codierenden mRNA im Vergleich zu einer Kontrollprobe unterscheiden.
16. Diagnostischer Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 15, der die DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und/oder den Antikörper nach Anspruch 12 oder das Fragment davon enthält.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

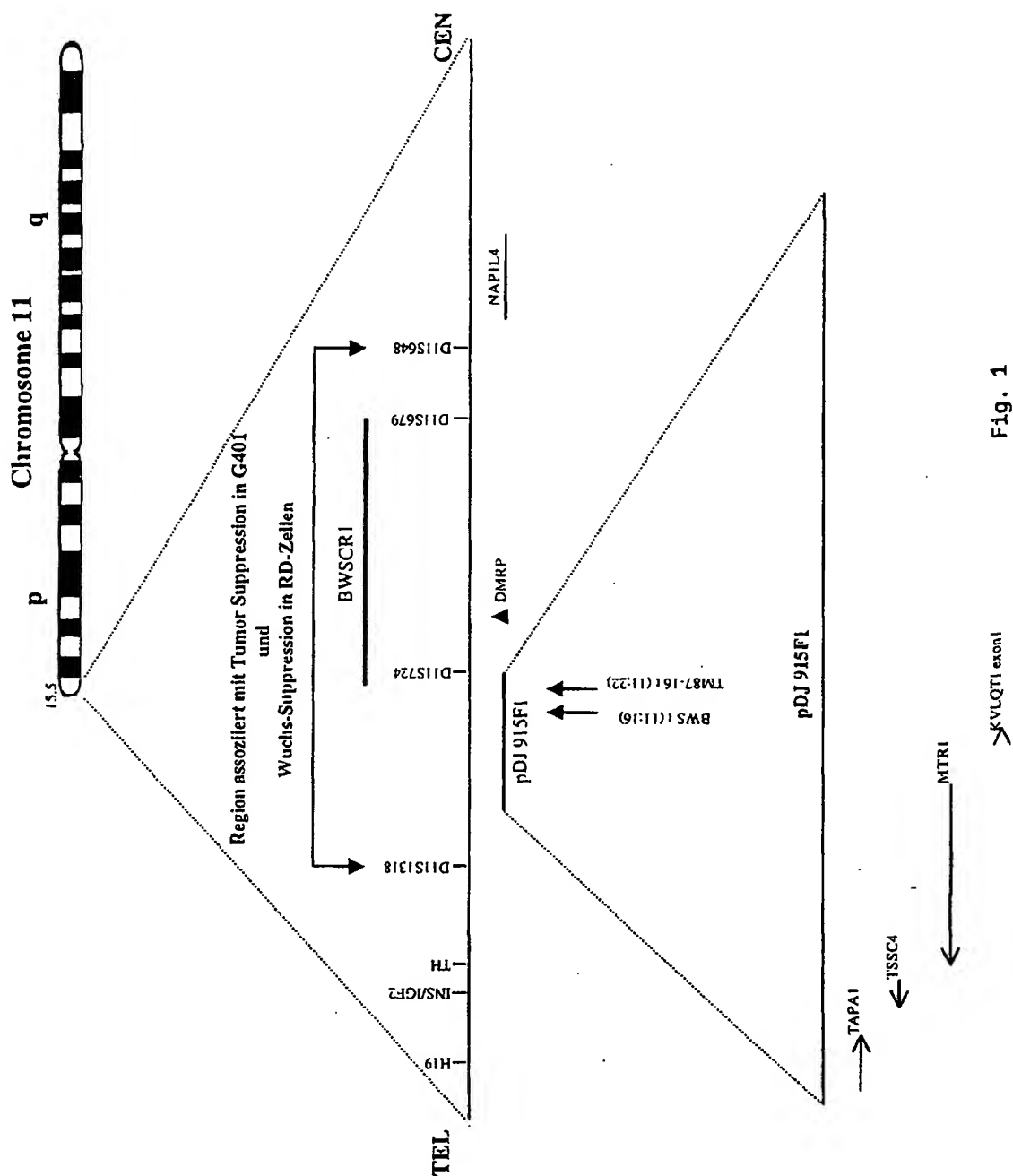
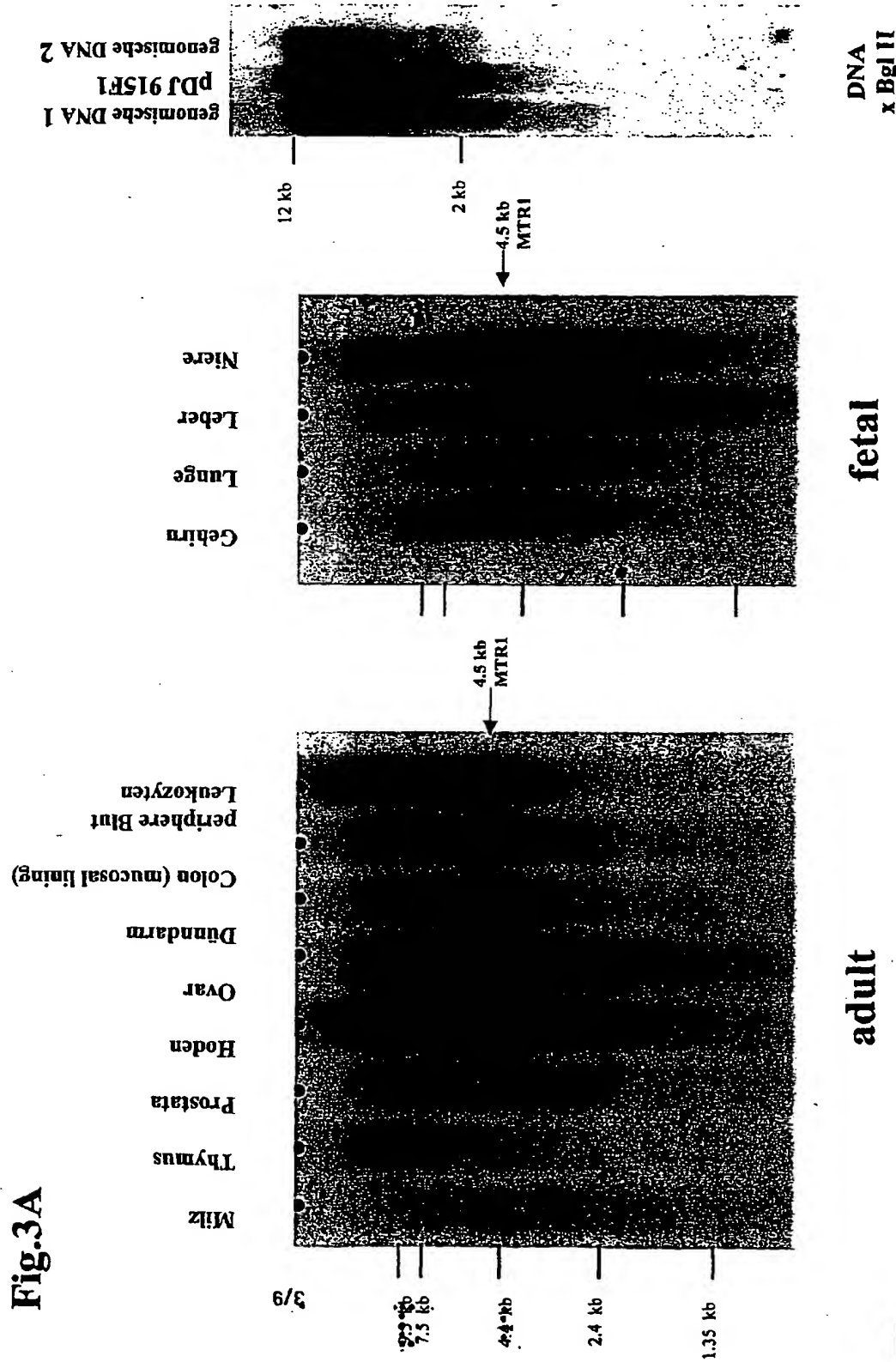


Fig. 1

Exon-Intron Grenzen des MTR1 Gens

	Splice Donor Bereich		Splice Akzeptor Bereich		Splice Donor Bereich		Splice Akzeptor Bereich	
Exon 1 >128 bp	...CACAGgtgag...	Intron 1	...tgagTTTGT...	Exon 2 181 bp	...CACAGgtgag...	Intron 2	...ccagGAGCC...	Exon 3
Exon 3 167 bp	...CCCAGgtgca...	Intron 3	...cgagGAGGA...	Exon 4 184 bp	...CGGGGgtgag...	Intron 4	...ccagGGCCT...	Exon 5
Exon 5 65 bp	...TGGAGgtgag...	Intron 5	...ctcagAGGAT...	Exon 6 192 bp	...AGCTGgtgag...	Intron 6	...ccagCTGCA...	Exon 7
Exon 7 103 bp	...GAAAGgtgag...	Intron 7	...ccagCCTGC...	Exon 8 119 bp	...GGAAGgtgag...	Intron 8	...ccagTCCTG...	Exon 9
Exon 9 351 bp	...GGGCGgtgag...	Intron 9	...ccagGAGAA...	Exon 10 141 bp	...CCATGgtgag...	Intron 10	...cgagGGCCA...	Exon 11
Exon 11 124 bp	...CCTTGgtgag...	Intron 11	...cgagGGCCT...	Exon 12 161 bp	...TTCAAGgtgag...	Intron 12	...ctcagGCCCT...	Exon 13
Exon 13 113 bp	...CTCAGgtgag...	Intron 13	...cgagTGAGG...	Exon 14 93 bp	...AGCCGgtgag...	Intron 14	...ccagGGTGG...	Exon 15
Exon 15 259 bp	...GGCAGgtgag...	Intron 15	...ccagGGCCT...	Exon 16 119 bp	...TGCAGgtgag...	Intron 16	...ccagGATGC...	Exon 17
Exon 17 133 bp	...GCATGgtgag...	Intron 17	...tgagATGAA...	Exon 18 175 bp alternatively spliced	...TGATGgtgag...	Intron 18	...ccagAAGCC...	Exon 20
Exon 20 154 bp	...TTCAGgtgag...	Intron 19	...tgagCTACA...	Exon 21 213 bp	...CCTGGgtgag...	Intron 20	...ccagAGAGA...	Exon 22
Exon 22 132 bp	...CACAGgtgag...	Intron 21	...cgagAGTGG...	Exon 23A 73 bp	...CACAGgtgag...	Intron 22	...ccagATCAA...	Exon 23B
Exon 23B 67 bp	...CCGGAgtag...	Intron 23	...agagGCTCT...	Exon 24 >514 bp				

Fig.2



	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Gehirn	Amygdala	Nucleus caudatus	Kleinhirn	Gehirnhinde	Lobus frontalis	Hippocampus	Medulla oblongata
B	Lobus occipitalis	Putamen	Substantia nigra	Lobus temporalis	Thalamus	Nucleus subthalamicus	Rückenmark	
C	Herz	Aorta	Skelettmuskel	Dickdarm	Blase	Uterus	Prostata	Magen
D	Hoden	Ovarien	Pankreas	Hypophyse	Nebenniere	Schilddrüse	Speicheldrüse	Milchdrüse
E	Niere	Leber	Dünndarm	Milz	Thymus	Periphere Leukozyten	Lymphknoten	Knochenmark
F	Blinddarm	Lunge	Trachea	Plazenta				
G	Fetale Hirn	Fetale Herz	Fetale Niere	Fetale Leber	Fetale Milz	Fetale Thymus	Fetale Lunge	
H	Gesamt-RNA (HeLa)	rRNA (HeLa)	rRNA (E. coli)	DNA (E. coli)	Poly (A)	humane Col DNA	humane DNA	500 bp

Fig.3B

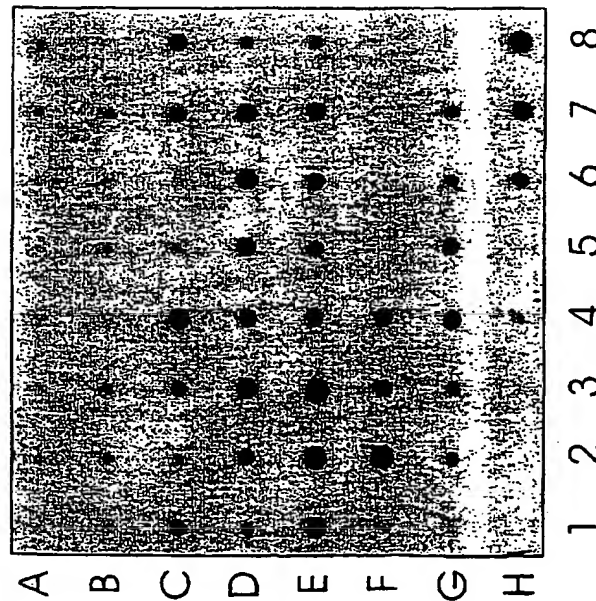
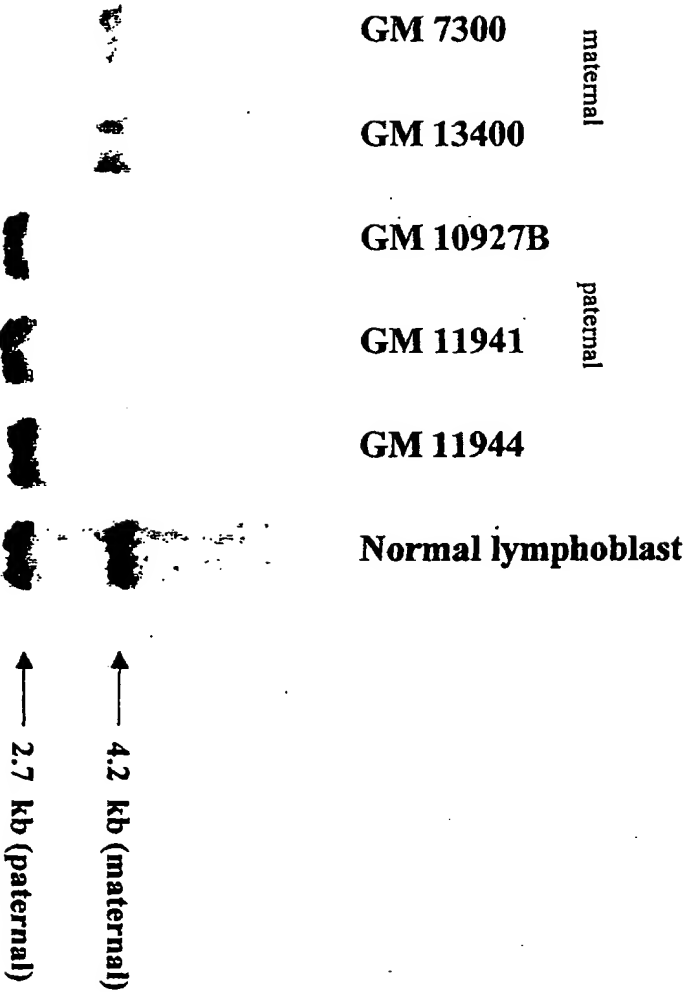


Fig.5A

**DNA x EcoR I / Not I
hybridisiert mit DMRP**



Nummer:

DE 199 53 167 A1

Int. Cl.7:

C 07 K 14/705

Offenlegungstag:

26. Juli 2001

Fig. 5B

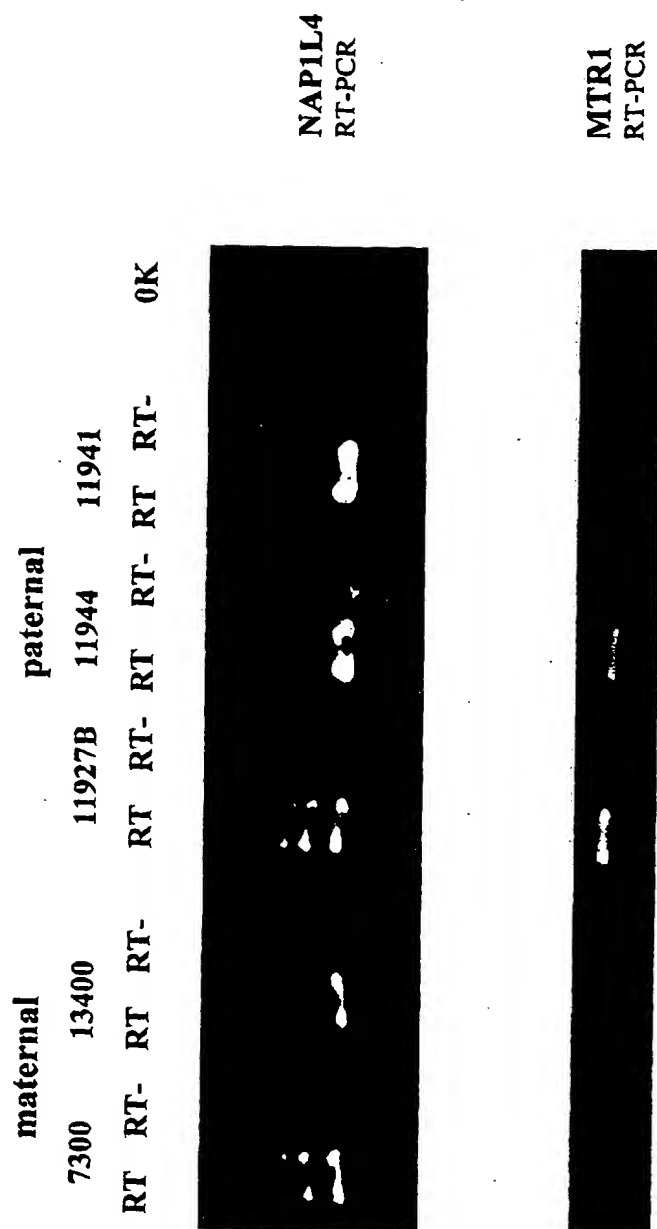
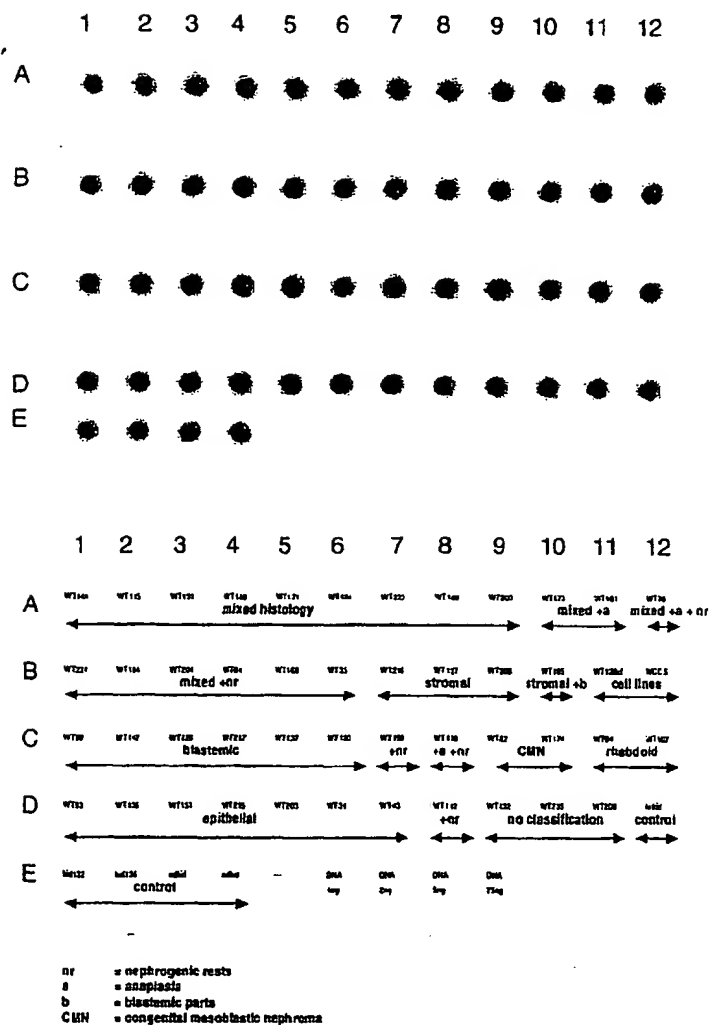


Fig.6

28S



MTR1

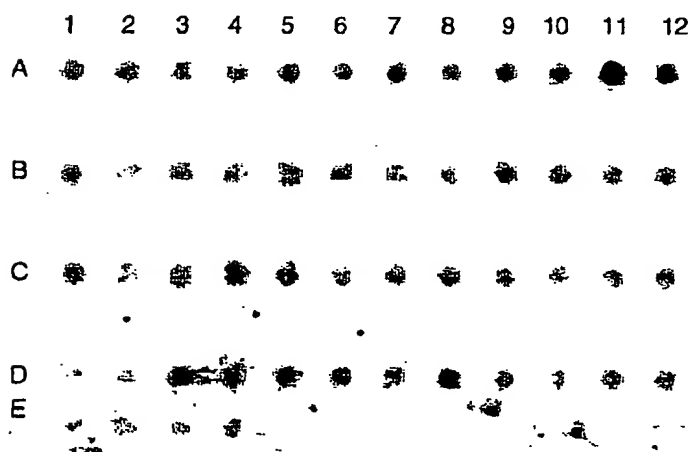


Fig.7

TM87-16

